Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
Direktor: Professor Dr. rer. nat. D. Mecke
der Universität Tübingen

Einfluß verschiedener Hemmstoffe auf das Bandenmuster des Insulinrezeptors in der SDS-Gelelektrophorese

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
MARIANNE INGEBORG HINZ
aus Reutlingen

1985

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
Direktor: Professor Dr. rer. nat. D. Mecke
der Universität Tübingen

Einfluß verschiedener Hemmstoffe auf das Bandenmuster des Insulinrezeptors in der SDS-Gelelektrophorese

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
MARIANNE INGEBORG HINZ
aus Reutlingen

1985

Dekan:	Professor Dr. med. M. Siess
1. Berichterstatter:	Professor Dr. rer.nat. U. Weber
2. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. M. Albinus

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

Die vorliegende Arbeit wurde am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulrich Weber durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Weber für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung dieser Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, welche mir die Durchführung dieser Arbeit durch vielfältige Hilfestellung wesentlich erleichtert haben und in vielen Diskussionen wertvolle Anregungen für die Bewältigung der Probleme boten.

Besonders hervorheben möchte ich Frl. Uschi Heckel, die mich laborchemisches Arbeiten lehrte und durch deren selbstverständliche Hilfsbereitschaft manche Versuche erst erfolgreich beendet werden konnten.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0029

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	ABKÜRZUNGEN UND SCHREIBWEISEN	12
3.	MATERIALIEN, GERÄTE, PUFFER	14
3.1.	Chemikalien, Biochemikalien	14
3.2.	Verbrauchsmaterial	16
3.3.	Versuchstiere	16
3.4.	Geräte	16
3.5.	Pufferlösungen	17
4.	METHODEN	18
4.1.	Reinigung von Insulin	18
4.2.	Präparation von MABI	18
4.3.	Jodierung von Insulin und MABI	18
4.3.1.	Jodierung von Insulin	18
4.3.2.	Jodierung von MABI	20
4.4.	Isolierung und Präparation der Leber-mikrosomen aus Rattenleber	22
4.5.	Extraktion des Rezeptors mit Triton-X-100	23
4.6.	Proteinbestimmungen	24
4.6.1.	Proteinbestimmung nach Lowry	24
4.6.2.	Proteinbestimmung nach Peterson	25
4.7.	^{125}J-Insulin-Bindungstest	25
4.7.1.	Bindung von ^{125}J-Insulin an Mikrosomen	25
4.7.2.	Bindung von ^{125}J-Insulin an solubilisierten Rezeptor	27
4.8.	Bestimmung des Insulinabbaus	27
4.9.	Photoaffinitätsmarkierung des Insulin-rezeptors	28
4.10.	Elektrophoresen	29
4.10.1.	Probenvorbereitung	30
4.10.2.	Durchführung der Elektrophoresen	30
4.10.3.	Färben von Gelen und Autoradiographie	31
4.10.4.	Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE	32

		Seite
5.	ERGEBNISSE	33
5.1.	Einfluß der getesteten Substanzen auf den ^{125}J-Insulinabbau	33
5.2.	Einfluß der getesteten Substanzen auf die ^{125}J-Insulinbindung an den Rezeptor	34
5.3.	Photoaffinitätsmarkierung und SDS-PAGE	35
5.4.	Molekulargewichtsbestimmung des Rezeptors und seiner Untereinheiten	36
5.5.	Hemmstoffe von SH-Gruppen tragenden Enzymen	38
5.5.1.	N-Ethylmaleinimid	38
5.5.2.	p-Chlormercuribenzoesäure, Na-Salz	40
5.5.3.	Jodacetamid	42
5.5.4.	Kupfersulfat	44
5.5.5.	Cytochalasin B	46
5.6.	Redoxreagenzien	49
5.6.1.	Glutathion, reduziert	49
5.6.2.	Glutathion, oxidiert	52
5.6.3.	2,6 Dichlorphenol-indophenol	54
5.6.4.	Phenazin-Methosulfat	56
5.6.5.	Kalium-Eisen(III)-Cyanid	58
5.6.6.	Methylenblau	60
5.6.7.	2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid	62
5.7.	Hemmstoffe der Atmungskette	64
5.7.1.	Natriumfluorid	64
5.7.2.	Kaliumcyanid	65
5.7.3.	2,4-Dinitro-phenol	65
5.8.	Chelatbildner	68
5.8.1.	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatrium-Salz	68
5.8.2.	1,10-Phenanthroliniumchlorid	70
5.9.	Lysosomotrope Wirkstoffe, Hemmstoffe der Rezeptorinternalisierung und Proteinbiosynthese	73
5.9.1.	Chloroquin-Diphosphat	73
5.9.2.	Lidocain	74
5.9.3.	Ammoniumchlorid	75

Seite

5.9.4. Colchicin 76
5.9.5. Dansylcadaverin 77
5.9.6. Cycloheximid 77
5.10. Hemmstoffe mit Einfluß auf den Kohlenhydratanteil des Insulinrezeptors 80
5.10.1. Tunicamycin 80
5.10.2. 2-Desoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure 81
5.11. Sonstige Proteasenhemmer 84
5.11.1. Phenylmethylsulfonylfluorid 84
5.11.2. 1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propan 86
5.11.3. Aprotinin 88
5.11.4. Leupeptin 89
5.11.5. Pepstatin 90
5.11.6. Antipain 90
5.12. Sonstige Hemmstoffe 93
5.12.1. Tris-(hydroxymethyl)aminomethan 93
5.12.2. Albumin 95
5.12.3. Bacitracin 97

6. DISKUSSION 101

7. ZUSAMMENFASSUNG 117

8. LITERATUR 118

1. EINLEITUNG

Bei der Homöostase des Stoffwechsels vielzelliger Organismen spielen die Hormone eine wichtige Rolle. Sie gehören verschiedensten Stoffklassen (Steroide, Aminosäure-Derivate, Peptide, Proteine) an, sie sind also chemisch betrachtet uneinheitlich. Ihr gemeinsames Kennzeichen besteht darin, daß sie in speziellen Organen, den endokrinen Drüsen, gebildet und auf dem Blutweg zu ihren Erfolgsorganen transportiert werden, um dort spezifische Wirkungen auszulösen. Im Gegensatz zu Enzymen entfaltet sich ihre Wirkung nur an komplexen Zellstrukturen (Zellmembranen, Enzymsystemen). Ihre Bildung und Ausschüttung wird durch übergeordnete Hormondrüsen und über positive und negative Rückkopplung z.T. durch die von ihnen bewirkten Stoffwechseleffekte, z.T. jedoch durch ihre Konjugations- bzw. Abbauprodukte kontrolliert. Die Hormone können im Stoffwechsel über eine Änderung von Enzymaktivitäten oder über eine Induktion bzw. Repression der Biosynthese von Enzymen und über Transportsysteme wirksam werden.

Das Hormon Insulin, Molekulargewicht ca. 6000, wird in den ß-Zellen der Langerhansschen Inseln, die 1 - 2 % des menschlichen Pankreasgewebes ausmachen, gebildet. Seit der Strukturaufklärung 1955 durch Sanger ist sicher, daß es sich um ein Proteohormon aus zwei parallel angeordneten Polypeptidketten handelt, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die B-Kette enthält 30 Aminosäuren, die A-Kette 21, sie ist zwischen zwei Cysteinresten in Position 6 und 11 durch eine weitere Disulfidbrücke verbunden. Hochwirksam greift es in entscheidender Weise in die Regulation des Kohlenhydrat-, Aminosäure- und Fettstoffwechsels ein. An den wesentlichen Erfolgsorganen (Leber, Muskel und Fettgewebe) umfaßt das komplexe Wirkungsspektrum so verschiedenartige Phänomene wie die Aktivierung membranöser Transportsysteme für Glucose und Aminosäuren, die Stimu-

lierung der Glykolyse, der Protein-, Lipid- und Glykogensynthese einerseits, und die Hemmung der Lipolyse, Proteolyse und Gluconeogenese andererseits (15).
Der molekulare Wirkungsmechanismus des Insulins ist nur in seinem Anfangsschritt bekannt. Im allgemeinen wird für Peptidhormone folgendes angenommen. Da Peptid- und andere wasserlösliche Hormone die Zelle nicht betreten können, sind zur Vermittlung und Verstärkung des Hormonsignals sogenannte Rezeptormoleküle an der Zellmembranaußenseite notwendig.

Nach heutiger Erkenntnis sind Rezeptoren Proteine, die ein Hormon mit hoher Spezifität und Affinität binden. Nach der Bildung des Hormon-Rezeptor-Komplexes kommt es zur Aktivierung eines Effektorsystems, das seinerseits durch Freisetzung eines sogenannten "second messenger" die intrazelluläre Übertragung des Hormonsignals bewirkt.
Das am besten bekannte Effektorsystem stellt hierbei die Adenylat-Zyklase dar, die nach Stimulierung vermehrt zyklisches AMP (cAMP) als "second messenger" in der Zelle verfügbar macht. Die Wirkung des cAMP selbst soll sowohl über eine Enzym- als auch eine Gen-Aktivierung vermittelt werden (25).
Über die Mechanismen, die letztlich zu den bekannten Insulinwirkungen führen, läßt sich allerdings noch nichts Gesichertes sagen. In Ergänzung zum genannten Adenylat-Zyklase-System werden als mögliche "second messenger" neben dem cAMP auch cGMP und Ca^{2+}-Ionen nicht ausgeschlossen. Außerdem intensiviert sich neuerdings die Suche nach einem Mediator, einem Peptid (10,47) oder Prostaglandinderivat (95), der Insulinwirkungen z.B. an Mitochondrien vermittelt. Ebenso kommen Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen als Folge der Hormon-Rezeptor-Bindung in der Plasmamembran in Frage.

Als gesichert darf angenommen werden, daß der Rezeptor nach initialer Bindungsreaktion mit dem Insulin internalisiert wird (37). Hierbei soll der Insulin-Rezeptor-Komplex nach

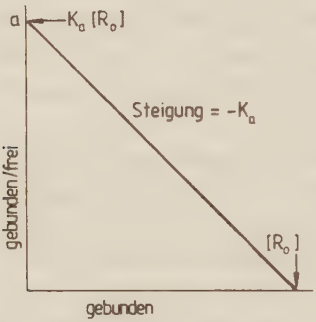
einer Umverteilung in der Membranebene innerhalb kleiner Endozytose-Vesikel in die Zelle eingeschleust werden. Eine Verschmelzung der Vesikel mit Lysosomen ermöglicht vermutlich den proteolytischen Abbau des Insulins. Für den Rezeptor selbst wird sowohl ein Abbau als auch ein "recycling" zur Membran diskutiert (27). Die Bedeutung der Insulininternalisierung für die Vermittlung oder Termination eines durch dieses Hormon induzierten Signals ist jedoch noch nicht geklärt. Ein möglicher Zusammenhang könnte mit den im endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat und in den Kernmembranen gefundenen intrazellulären Insulinrezeptor bestehen (18).
Die Regulation des Rezeptors erfolgt in Abhängigkeit von der Höhe des Insulinspiegels entweder durch Änderung der Affinität (negative Kooperativität) (20) oder durch Änderung der Rezeptorzahl (down-regulation) (33).

Das Konzept eines spezifischen Insulinrezeptors existiert seit nunmehr etwa 25 Jahren und geht auf Studien von Levin und Goldstein zurück (65).
Unsere heutigen Kenntnisse über den Insulinrezeptor stammen zu einem wesentlichen Anteil aus der direkten Untersuchung der Insulinbindung an intakte Zellen, Membranpräparationen und mit Hilfe von Detergenzien solubilisiertem Insulinrezeptor aus Zielgeweben für dieses Hormon. Es konnten jedoch auch Insulinrezeptoren in anderen Geweben nachgewiesen werden, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht als Zielgewebe angesehen wurden (12,30,46,50).

Zur Durchführung derartiger Bindungs-Experimente ist die Verwendung eines mit radioaktivem Jod markierten Insulins notwendig. In Bindungsstudien inkubiert man unter genau definierten Bedingungen ^{125}J-Insulin mit isolierten Zellen, Zellmembranen oder gelöstem Rezeptor. Anschließend erfolgt die Trennung von gebundenem Material und nicht gebundenem Insulin durch Membranfiltration, Zentrifugation oder Fällungsmethoden und die Messung der gebundenen Radioaktivi-

tät.

Für die Analyse und grafische Darstellung von Bindungsdaten wird sehr häufig der sogenannte Scatchard-Plot verwendet. Im Falle einer homogenen Bindungsstelle erhält man eine Gerade, aus deren Steigung bzw. Abszissenabschnitt direkt die Affinität bzw. die Rezeptorzahl bestimmt werden können.



Dem Scatchard-Plot liegt eine Umformung des Massenwirkungsgesetzes zugrunde; im Gleichgewicht der Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung ist die Assoziationskonstante bestimmt durch:

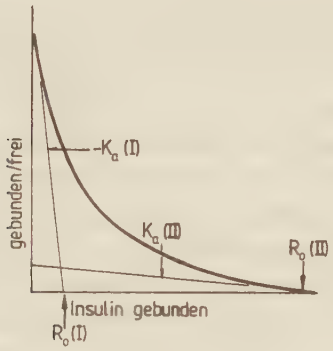
$$K_a = \frac{[HR]}{[H] \times [R]}$$

Hierbei bedeutet $[HR]$ die Konzentration an Hormon-Rezeptor-Komplex, $[H]$ die Konzentration an freiem Hormon und $[R]$ die Konzentration an freiem Rezeptor. Ersetzt man $[R]$ durch den Ausdruck $[R] = [R_o] - [HR]$, wobei $[R_o]$ die Gesamtkonzentration an Rezeptor bedeutet, so erhält man:

$$K_a = \frac{[HR]}{([R_o] - [HR]) \times [H]} \quad \text{oder} \quad \frac{[HR]}{[H]} = -K_a [HR] + K_a [R_o]$$

Trägt man $[HR] / [H]$ ($\hat{=}$ bound/free) als Funktion von $[HR]$ ($\hat{=}$ bound) auf, so erhält man eine Gerade, deren negative Steigung der Assoziationskonstanten K_a, und deren Abszissenabschnitt der Gesamtkonzentration an Rezeptor $[R_o]$ entspricht.

Eine Analyse der Insulin-Rezeptor-Bindung ergab bisher für fast alle Rezeptorpräparationen nichtlineare Scatchard-Diagramme mit Dissoziationskonstanten $K_d = \frac{1}{K_a}$ von 10^{-8} - 10^{-10}.



Diese Nichtlinearität kann verschiedene Ursachen haben:

1.) Vorhandensein von verschiedenen Bindungsstellen mit unterschiedlicher Assoziationskonstante.
2.) Negative Kooperativität, d.h. durch Bindung von einem Insulinmolekül wird die Bindung weiterer Insuline erschwert.
3.) Verwendung eines Hormongemisches mit unterschiedlicher Affinität der Einzelkomponenten zum Rezeptor, verursacht durch Unterschiede von nativem und jodiertem Insulin.

Solche nichtlinearen Scatchard Diagramme lassen sich in jedem Fall in zwei oder mehr Geraden zerlegen und dadurch die Bindungsparameter der Bindungsstellen ermitteln. Häufig ist es jedoch schwierig zu entscheiden, ob negative Kooperativität vorliegt oder ob tatsächlich zwei oder mehr verschiedene Bindungsstellen existieren. Beide Möglichkeiten werden diskutiert.

Will man aus solchen Bindungsstudien verläßliche Ergebnisse erhalten, muß man einige kritische Punkte beachten:

1.) Das verwendete ^{125}J-Insulin darf sich in seinen Bindungseigenschaften möglichst nicht vom natürlichen Insulin unterscheiden. Die Einführung eines Jodatoms, das ungefähr die Größe eines Benzolrings hat, und erst recht die Einführung mehrerer Jodatome kann aber die Bindungseigenschaften stark beeinflussen. So hat nur das am Tyr-A14 markierte Mono-Jodinsulin, das glücklicherweise bevorzugt bei der Jodierung von Insulin mittels Lactoperoxidase gebildet wird, noch volle Bindungsfähigkeit, während bereits die Bindungsfähigkeit von Tyr-A19 markiertem Mono-Jodinsulin stark eingeschränkt ist und bei höher jodierten Insulinen gegen Null geht.
2.) Sämtliche Bindungstests haben gemeinsam, daß der nur in sehr geringen Konzentrationen im Inkubationsansatz enthaltene Insulinrezeptor (10^{-9} - 10^{-11} M) mit sehr niedrigen Konzentrationen an ^{125}J-Insulin (10^{-8} - 10^{-11} M) inkubiert wird. Da die Bindungskurven aus der Bestimmung von rezeptorgebundenem Insulin und freiem Insulin erhalten werden, muß unbedingt sichergestellt sein, daß der Insulinrezeptor und das markierte Insulin im Inkubationsansatz intakt und voll verfügbar sind. Dabei ist bereits die Bindung von Insulin an die Wand der verwendeten Inkubationsgefäße und vor allem der Abbau von Insulin und Rezeptor während des Tests durch abbauende Enzyme zu berücksichtigen.

Das aus Bindungsstudien stammende Datenmaterial erlaubt es, allgemeingültige Aussagen über den Insulinrezeptor zu machen. Er zeichnet sich danach durch folgende Eigenschaften aus:

- Die Insulinbindung ist sättigbar, d.h. die Zahl der verfügbaren Bindungsstellen ist begrenzt.

- Die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor ist reversibel und durch höhere Ionenstärken stimulierbar.
- Der Rezeptor besitzt ein hohes Maß an Spezifität, was für seine Erkennungsfunktion von ausschlaggebender Bedeutung ist; er bindet das Insulinmolekül mit hoher Affinität, während modifizierte Insuline bzw. andere Peptidhormone nur mit niedriger Affinität oder überhaupt nicht gebunden werden.
- Die Insulinbindung unterliegt einer ausgeprägten pH-Abhängigkeit mit einem Maximum zwischen pH 7,8 und 8,0.
- Die Bindung an den Rezeptor zeigt eine deutliche Temperaturabhängigkeit. Steigende Temperaturen führen zu einer geringeren Bindung, da die Affinität zwischen Insulin und Rezeptor bei steigender Temperatur schlechter wird (kleinere K_a-Werte oder größere K_d-Werte).

Die chemische und molekulare Struktur des Insulinrezeptors ist auch heute noch weitgehend unbekannt, was vor allem darauf beruht, daß die Reindarstellung des Rezeptors, die eine Röntgenstrukturanalyse ermöglichen würde, erhebliche Probleme mit sich bringt. Die Strukturaufklärung mittels hochauflösender Elektronenmikroskopie bedarf auf der anderen Seite einer heute noch nicht verfügbaren Kontrastierungstechnik (60).

Derzeit möglich ist die Anreicherung eines partiell gereinigten Insulinrezeptors unter anderem durch Fällung mit Concanavalin A direkt aus Extrakten (57). Concanavalin A ist ein Lektin pflanzlichen Ursprungs, das spezifisch Kohlenhydrate und Glykoproteine bindet, die α-D-Mannoside enthalten. An Sepharose gebunden, wird es häufig zur Affinitätschromatographie verwendet, wobei mannosehaltige Verbindungen gebunden werden. Alle anderen Glykoproteine und Nichtglykoproteine werden abgetrennt. Durch Waschen mit hohen Konzentrationen an α-D-Methylmannose läßt sich das gebundene mannosehaltige Material wieder eluieren. Bei der

erwähnten Fällungsmethode gelingt es, bis zu 80 % des Insulinrezeptors neben anderen Glykoproteinen durch Concanavalin A auszufällen und durch Zentrifugation abzutrennen. Aus dem gewaschenen Pellet läßt sich durch 0,3 - 0,5 M α-D-Methylmannose der Insulinrezeptor wieder quantitativ eluieren und so ca. 80 % der Begleitproteine einschließlich der gesamten insulinabbauenden Enzymaktivität abtrennen. Andere Reinigungs- und Trennverfahren sind: Gelfiltration an Sepharose CL-4 B und CL-6 B, Affinitätschromatographie an WGA-Sepharose, Affinitätschromatographie an Insulin-Sepharose, Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Cellulose, Adsorptionschromatographie an Hydroxyapatit, Isoelektrische Fokussierung, Ammonsulfatfällung, Immunpräzipitation und Immunaffinitätschromatographie (56).

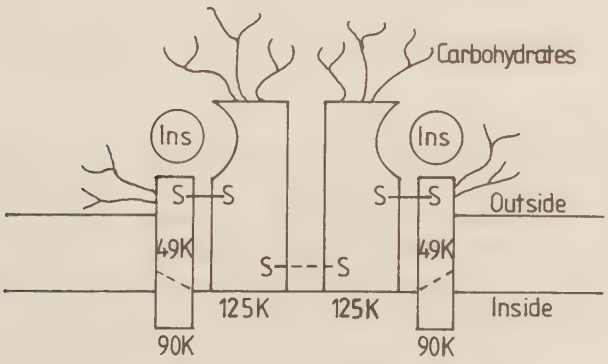
Das meistens angewandte Verfahren zur Untersuchung von Grösse und Struktur des Rezeptors ist SDS-PAGE und Autoradiographie nach radioaktiver Markierung des Proteins. Neben der in dieser Arbeit zur Markierung des Rezeptors angewandten Technik, der Photoaffinitätsmarkierung mit ^{125}J-Insulin-Derivaten, die eine photoreaktive Gruppe tragen, gibt es noch weitere Möglichkeiten: chemische Vernetzung (crosslinking) von ^{125}J-Insulin und Rezeptor mit Disuccinimidyl-Suberat, Markierung des Rezeptors mit ^{125}Jod nach der Lactoperoxidase-Methode bzw. Chloramin T-Methode, sowie die biosynthetische Markierung mit ^{35}S-Methionin und mit "schweren" Aminosäuren (^{2}H, ^{13}C, ^{15}N) (56).

All diese indirekten Studien haben gezeigt, daß es sich bei diesem Rezeptor um ein Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil, der Mannose, Galaktose, N-Acetyl-Glucosamin und Sialinsäuren enthält, handeln muß (56).
Zwischen den Insulinrezeptoren verschiedenartiger Gewebe lassen sich nur geringfügige Unterschiede feststellen. Vergleicht man die Insulinrezeptoren verschiedener Spezies (Mensch, Nagetiere, Vögel, Fische) in ihrem Bindungsverhalten gegenüber einem bestimmten Insulin (z.B. Schweine-

Insulin), so läßt sich eine bemerkenswerte Konstanz des Insulinrezeptors feststellen, was darauf hinweist, daß das Insulinmolekül selbst weit mehr als sein Rezeptor durch evolutionäre Einflüsse verändert worden ist (74).

Das erste Modell dieses Rezeptors wurde von Ginsberg et al. (34) aufgestellt. Aufgrund seiner Versuche mit gelöstem Truthahn-Erythrocyten-Rezeptor, analysiert durch Gelfiltration, postulierte er einen Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 300 000, der aus vier gleichen Untereinheiten von je MG 75 000 aufgebaut sein soll, in die er unter dem Einfluß von Insulin wieder dissoziiert.
Maturo et al. (71) entwickelte nach Bindungsstudien und Gelfiltration verschiedener Gewebe ein zweites Modell. Aus dem von ihm gefundenen 72 Å-Rezeptor (MG 300 000) entsteht durch Abtrennung eines nicht Insulin-bindenden Glykoproteins eine zweite Rezeptorspezies von 38 Å. Diesem Glykoprotein schrieb er bindungsmodifizierende, signalübertragende Effektorfunktion zu.
An ein ähnliches Rezeptor-Effektor-Modell glauben Krupp et al. (61) und Harmon et al. (40).
Ein heute viel diskutiertes drittes Modell stammt von Czech und Massague (16,70) sowie von Jacobs et al. (44). Aufgrund ihrer Ergebnisse bei der SDS-PAGE soll der Rezeptor in der Form $(\alpha\beta)_2$ und über Disulfidbrücken in folgender Weise aufgebaut sein:

ß-SS-α-SS-α-SS-ß



Das Molekulargewicht von α soll dabei 125 000 - 135 000 und von ß 90 000 betragen. ß kann proteolytisch gespalten werden $\Rightarrow$ $ß_1$ = MG 49 000.
Die Banden, die man nach diesem Modell in der SDS-PAGE erhält, sind:

ohne Reduktion	$(\alpha ß)_2$	$\hat{=}$ MG 350 000
	$(\alpha ß)(\alpha ß_1)$	$\hat{=}$ MG 320 000
	$(\alpha ß_1)_2$	$\hat{=}$ MG 290 000
bei schwacher Reduktion	$(\alpha ß)$	$\hat{=}$ MG 210 000
	$(\alpha ß_1)$	$\hat{=}$ MG 160 000
bei starker Reduktion	α	$\hat{=}$ MG 125 000
	ß	$\hat{=}$ MG 90 000
	$ß_1$	$\hat{=}$ MG 49 000

Da aber auch dieses Modell nicht allen gefundenen Ergebnissen Rechnung trägt, werden in jüngster Zeit erneut Vorschläge für die Struktur des Insulinrezeptors gemacht.
Yip et al. (98) schlägt nach Versuchen mit Rattenleberfettzellen und SDS-PAGE-Analyse ein asymmetrisches Tetramer vor, wonach der native Rezeptor (MG 300 000) durch Reduktion seiner Disulfidbrücken in Untereinheiten von 130 000, 90 000 und 40 000 aufteilbar ist.
Das Modell von Baron (3) ist ebenfalls ein asymmetrisches, bestehend aus zwei α-Untereinheiten (120 000), einer ß-Untereinheit (95 000) und einer δ-Untereinheit (65 000). Diese Untereinheiten sollen durch hydrophobe Bindungen aneinanderhaften.
Auch die in der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen (18,52,54,56,59) führen zu anderen Modellvorstellungen.

Diese unterschiedlichen Strukturmodelle beruhen zum größten Teil auf den in Elektrophoreseexperimenten jeweils gefundenen Rezeptoruntereinheiten. Nach wie vor unklar ist jedoch, ob die gefundenen Untereinheiten tatsächlich in vivo gebildet werden oder ob es artifizielle, bei der Marterialaufarbeitung entstandene Spaltprodukte sind.

In dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob es Substanzen gibt, die in irgendeiner Weise das Bandenmuster des Insulinrezeptors in der SDS-Gelelektrophorese beeinflussen. Neben Substanzen, die den Rezeptor direkt chemisch beeinflussen können (z.B. Redoxreagenzien) wurden spezifische Gruppenreagenzien (z.B. SH-blockierende Substanzen) sowie Hemmstoffe möglicher Rezeptorabbauenzyme (z.B. Proteasen-Inhibitoren) gewählt. Darüber hinaus wurden einige Hemmstoffe berücksichtigt, die in funktionelle Systeme eingreifen, von denen bekannt ist oder vermutet wird, daß sie beim Rezeptormetabolismus oder der Insulinwirkung eine Rolle spielen (Internalisierung, Proteinbiosynthese, Energiebereitstellung).
Der Einfluß dieser Substanzen auf das Bandenmuster könnte dann Aufschluß über die Entstehung der Untereinheiten geben. Daraus wiederum könnte auf die Struktur des Rezeptors geschlossen werden.

2. Abkürzungen und Schreibweisen

A14-^{125}J-Insulin	Mono-^{125}J-(Tyr^{A14})-Insulin
Bis	N,N'-Methylen-Bisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie $\hat{=}$ 2,22 x 10^{12} Zerfälle/min $\hat{=}$ 3,7 x 10^{10} Becquerel
cpm	Impulse/min
DCIP	2,6-Dichlorphenol-indophenol, Na-Salz
DDANS	2,3-Dehydro-2-desoxy-N-acetyl-neuraminsäure
DNP	2,4-Dinitrophenol
DTE	Dithioerythrit
EDTA-Na_2	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
EPNP	1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propan
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
HMP	Homogenisationsmedium, Phosphat
KNaPP	Kalium-Natrium-Phosphatpuffer
M	molar
MG	Molekulargewicht
MABI	N$^{\varepsilon B29}$-(4-Azidobenzoyl)-Insulin
N	normal
NEM	N-Ethyl-maleinimid
p-CMB	p-Chlormercuribenzoesäure, Na-Salz
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R_f	relative Laufstrecke
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEX	Tritonextrakt

Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
Triton	Triton-X-100
TTC	2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid

Prozentangaben in dieser Arbeit sind als % (w/v) zu verstehen, Ausnahmen sind im Text gekennzeichnet.

Zur Schreibweise von Puffern sei ein Beispiel gegeben:

0,1 M KNaPP pH 7.4/ 0,1 BSA
≙ 0,1 M KNaPP pH 7.4 mit einem Gehalt von 0,1 % BSA

Zur Schreibweise der Pufferbedingungen für die Bindungstests in Kap. 5.5. - 5.12.:

0,1/8,0 ≙ Bedingung I ≙ 0,1 M KNaPP pH 8,0
0,01/7,0 ≙ Bedingung II ≙ 0,01 M MNapp pH 7,0

3. MATERIALIEN - GERÄTE - PUFFER

3.1. Chemikalien, Biochemikalien

Acrylamid (speziell gereinigt für die Elektrophorese)	BDH, Poole (England)
Albumin aus Rinderserum (Fraktion V, 96-99 %)	Sigma, München
Aldolase aus Kaninchenmuskel	Boehringer, Mannheim
Antipain Dihydrochlorid	Sigma, München
Aprotinin (Trasylol) 10.000 KIE/ml	Bayer, Leverkusen
Bacitracin (mind. 50.000 Units/g)	Sigma, München
Bromphenolblau, Natriumsalz (reinst)	Serva, Heidelberg
Chloroquin Diphosphat (pharm.)	Serva, Heidelberg
Colchicin (krist.)	Sigma, München
Coomassie Brillant Blue R-250 (rein)	Sigma, München
Cycloheximid (krist.)	Sigma, München
Cytochalasin B aus Helminthosporium dematioideum (krist.)	Sigma, München
Decon 90	BDH, Poole (England)
2,3-Dehydro-2-desoxy-N-acetylneuraminsäure (90-95 %)	Sigma, München
2,6-Dichlorphenol-indophenol, Natriumsalz, Grade I, (krist.)	Sigma, München
Dithioerythrit (reinst)	Serva, Heidelberg
1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propan (pract., krist.)	Sigma, München
ß-Galactosidase aus E. choli (G-8510)	Sigma, München
γ-Globulin aus Rinderserum (krist., etwa 98 %)	Serva, Heidelberg
Glutathion, oxidiert	Papierwerke "Waldorf-Aschaffenburg" AG, Waldorf
Glutathion, reduziert	
Glycin p.A.	Serva, Heidelberg
Jodacetamid (reinst)	Serva, Heidelberg
Katalase aus Rinderleber	Boehringer, Mannheim

Leupeptin	Sigma, München
Lidocain (krist.)	Sigma, München
Methylenblau	Bayer, Leverkusen
Mono-Dansylcadaverin (krist.)	Sigma, München
Myosin aus Kaninchenmuskel (M-3889)	Sigma, München
$Na^{125}J$ (0,1 Ci/ml)	Amersham-Buchler, Braunschweig
Natriumdodecylsulfat (krist., reinst, mind. 99 %)	Serva, Heidelberg
N-Ethylmaleinimid (reinst, mind. 99 %)	Serva, Heidelberg
N,N'-Methylenbisacrylamid (speziell gereinigt für die Elektrophorese, vor Gebrauch einmal aus Aceton umkristallisiert)	BDH, Poole (England)
N-Methylphenazinium-methylsulfat (reinst)	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (rein)	Serva, Heidelberg
Ovalbumin	Sigma, München
p-Chlormercuribenzoesäure Natriumsalz (reinst)	Serva, Heidelberg
Pepstatin A	Sigma, München
1,10-Phenanthroliniumchlorid (Monohydrat) p.A.	Serva, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (reinst)	Serva, Heidelberg
Phosphorylase b aus Kaninchen-muskel (P-6635)	Sigma, München
Polyethylenglykol (Carbowax 6000)	Serva, Heidelberg
Rinderinsulin (monokomponent) zinkhaltig, 27,2 U/mg	Novo, Kopenhagen (Dänemark)
RNA-Polymerase aus E. choli	Boehringer, Mannheim
Röntgenentwickler- und -fixier-salz	Adefo, Nürnberg
2,3,5-Triphenyl-tetrazoliumchlorid	Sigma, München
Triton-X-100 p.A.	Serva, Heidelberg
TRIZMA Base	Sigma, München
TRIZMA preset pH 8,7	Sigma, München
Tunicamycin	Sigma, München

Alle nicht extra aufgeführten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

Spectrin wurde nach der Methode von Kelm (52) präpariert.

3.2. Verbrauchsmaterial

Chromatographiepapier 3 mm	Whatman, Meidstone (England)
Polystryrolreagenzgläser 11 x 70 mm, 12 x 75 mm, 16 x 100 mm	Greiner, Nürtingen
Röntgenfilm Kodak X-O-MAT AR (XAR-5), 20 x 25 cm	Eastman Kodak Comp., Rochester, N.Y. (USA)

3.3. Versuchstiere

Zur Gewinnung von Lebermikrosomen wurden männliche Ratten (Sprague-Dawley) mit einem Körpergewicht von mindestens 200 g verwendet. Sie wurden von der Süddeutschen Versuchstierfarm, Tuttlingen bezogen oder entstammten der hauseigenen Weiterzucht. Aus letzterem Bestand wurden auch weibliche Tiere verwendet.

3.4. Geräte

Zentrifugen:

Minifuge II mit Tragringrotor 3350	Heraeus-Christ, Osterode
Servall "Automatic Superspeed" mit Rotor SS 34	Hormuth-Vetter, Heidelberg-Wiesloch
Beckmann L 5-65 und L2-65 mit Rotor 65 Ti	Beckmann, München
Kühlzentrifuge G 50 K mit Rotor 6 x 250	WKF-Forschungsgeräte, Modautal 3

Gammacounter:

Kontron MR 480 TP	Kontron, München

Elektrophoresegeräte:	
Power Supply SKB 2197	LKB, Bromma (Schweden)
Elektrophoresekammer "Protean Dual Vertical Slab"	Biorad, München
Aldo-Xer Geltrockner	Schütt, Göttingen
Gefrierschrank VK 85-300 S (- 80° C)	Colora, Lorch
Photometer M 4 Q II mit PM Q II	Zeiss, Oberkochen
Digital pH-Meter	Bachofer, Reutlingen
Homogenisator Potter S mit Teflonkolben	Braun, Melsungen
UV-Lampe Philips HPK 125 W	Philips, Hamburg
Röntgen-Verstärkerfolien:	
Chronex Hi-Plus und Par Speed	Du Pont de Nemours, Frankfurt
Titan 2 U	Siemens, Erlangen

3.5. Pufferlösungen

Kalium-Natrium-Phosphat-Puffer (KNaPP):

Na_2HPO_4 und KH_2PO_4 werden getrennt in der entsprechenden Konzentration angesetzt und am pH-Meter bis zum gewünschten pH gemischt.

Waschpuffer (vgl. Kap. 4.4.1.)

Homogenisationsmedium, Phosphat (HMP):

0.01 M Na_2HPO_4 und KH_2PO_4 werden getrennt mit 0.25 M Sucrose angesetzt und am pH-Meter bis pH 7.4 gemischt.

4. METHODEN

4.1. Reinigung von Insulin

300 mg Rinderinsulin, gelöst in 14 ml 1 M Essigsäure, werden mit 1 ml 5 % EDTA-Na_2 zum Entzinken versetzt. Mittels Gelfiltration an Sephadex G 50 fine (Säule 4 x 100 cm) wird das Gemisch nach 15 Min. Rühren bei Raumtemperatur in 1 M Essigsäure aufgetrennt. Anschließend vereinigt und lyophilisiert man die Insulin enthaltenden Fraktionen. Die Ausbeute an entzinktem Insulin liegt bei etwa 80 %.

4.2. Präparation von MABI

Die Präparation von MABI erfolgt nach der Methode von Yip und Yeung (96), modifiziert nach Klotz (53,54). Gereinigtes, in Dimethylformamid gelöstes Insulin wird bei Dunkelheit und in Gegenwart von Triethylamin mit dem N-Hydroxysuccinimidester der 4-Azidobenzoesäure versetzt. Um MABI von höher substituierten Insulinderivaten abzutrennen, wird das Reaktionsgemisch durch Ionenaustauschchromatographie an SP-Sephadex C-25 aufgetrennt. Die Entsalzung der erhaltenen MABI-Fraktionen erfolgt mittels Gelfiltration an Sephadex G 25 fine. Nach Lyophilisation kann MABI bei - 30° C aufbewahrt werden. Ausführliche Beschreibung der Präparation siehe (56).

4.3. Jodierung von Insulin und MABI

4.3.1. Jodierung von Insulin

Zur Präparation von A14-^{125}J-Insulin kommt die Jodierung mit Lactoperoxidase nach Jørgensen und Larsen (48), modifiziert nach Kelm (52), zur Anwendung.
Die Durchführung der Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur.

In ein Plastikreagenzglas werden pipettiert:

30 µl $Na^{125}J$ (≙ 3 mCi)
25 µl 0,4 M KNaPP pH 7,2
25 µl monokomponentes Rinderinsulin
(40 mg/ml in 0,04 M HCL)
10 µl H_2O_2 (0,32 mM in H_2O)
10 µl Lactoperoxidase (7,7 U/ml in H_2O)

1 Min. vortexen

100 µl EDTA-Na_2 (10 mM in H_2O)
1 ml Lysinpuffer / 1 % BSA (reinst)

erneut vortexen.

Monokomponentes Insulin und Lactoperoxidaselösung werden erst unmittelbar vor dem Pipettieren angesetzt.

Der ^{125}J-Einbau in Insulin wird mittels TCA-Fällung bestimmt. Er liegt bei etwa 95 - 99 %. Die Auftrennung des Reaktionsgemisches erfolgt durch Ionenaustausch an QAE-Sephadex A 25 bei 20° C:

Säule: 1.0 x 25 cm/QAE-Sephadex A 25
mit mindestens 300 ml Elutionspuffer
äquilibriert

Elution: Lysinpuffer / 1 % BSA (reinst) /
(Behring-Werke, Marburg)
0.002 % Chlorhexidin

Elutionsgeschwindigkeit: 10,5 ml/h

Fraktionsvolumen: 6 ml

Zur Bestimmung des Elutionsverlaufes wird aus jeder Fraktion, nach Sammlung bei 20° C ein 5 µl Aliquot entnommen und im Gammacounter ausgezählt. Die Löslichkeit der Radioaktivität wird anschließend in 5 % TCA geprüft. Es treten 2 Peaks auf. Peak I mit A19-^{125}J-Insulin und Peak II mit A14-^{125}J-Insulin. Die Peak II-Fraktionen, deren spezifische Radioaktivität bei ca. 160 - 200 µCi/µg Insulin liegt, werden gesammelt und bei - 30° C gelagert.

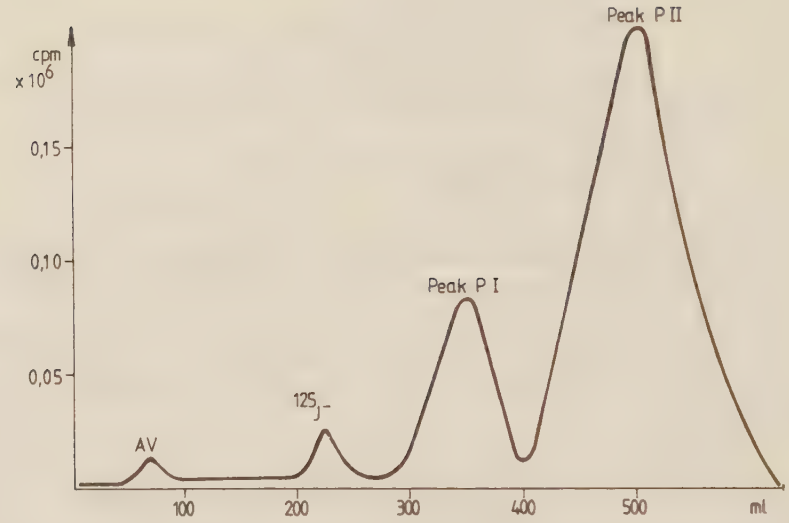


Abb. 1: Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatoraphie einer typischen Jodierung nach der Lactoperoxidase Methode.
AV = Ausschlußvolumen

4.3.2. Jodierung von MABI

MABI wird mit Chloramin T bei Raumtemperatur nach Hunter und Greenwood (42), modifiziert nach Koch (56) jodiert.

In ein Reagenzglas werden im Dunkeln pipettiert:

10 µl $Na^{125}J$ (≙ 1 mCi)
100 µl 0,1 M KNaPP pH 7,4
10 µl MABI (0,4 mg/ml in 0,1 M KNaPP pH 7,4)
20 µl Chloramin T (1 mg/ml in H_2O)

Reaktion erfolgt unter Vortexen (40 sec)

20 µl $Na_2S_2O_5$ (3 mg/ml) in H_2O)

erneutes Vortexen

10 µl 0,1 M KNaPP pH 7,4 / 2 % BSA (RIA-grade) / (Sigma, München)
0,5 % Triton

vortexen.

Die Insulin-, Chloramin T- und Natriummetabisulfitlösungen werden erst unmittelbar vor dem Pipettieren angesetzt und in einem 5 µl Aliquot aus dem Reaktionsgemisch die Löslichkeit der Radioaktivität in 5 % TCA bestimmt.

Die Auftrennung erfolgt mittels Gelfiltration bei 2° C:

Säule: 1,1 x 50 cm / Sephadex G 50 fine
Elutionspuffer: 0,1 M KNaPP pH 7,4 / 0,1 % Triton
Elutionsgeschwindigkeit: 10 ml/h
Fraktionsvolumen: 1,0 ml

Durch Entnahme eines 5 µl Aliquots einer jeden Fraktion und Auszählen im Gammacounter wird der Elutionsverlauf geprüft. Eine anschließende TCA-Fällung läßt die Fraktionen des ^{125}J-MABI-Peaks auffinden und gibt Aufschluß über die Qualität des eluierten ^{125}J-MABI. Spitzenfraktionen (ca. 200 - 250 µCi/µg MABI) werden bei - 30° C eingefroren und gelagert.

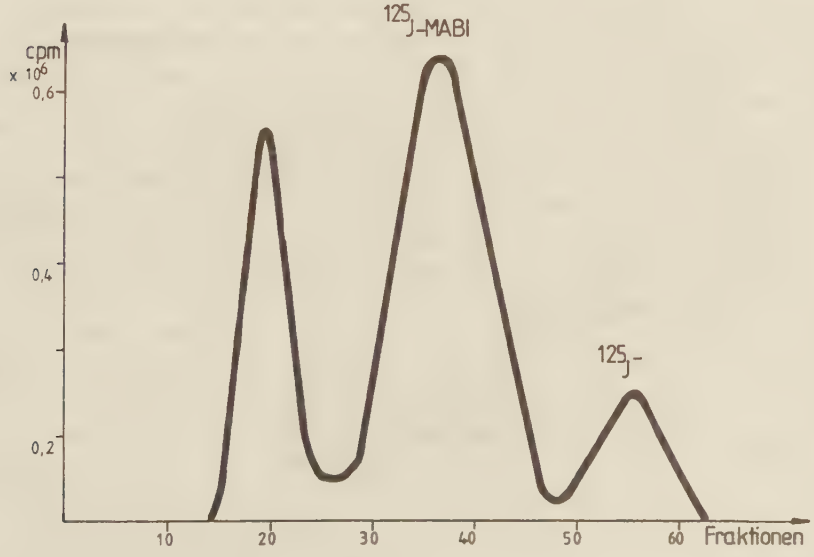


Abb. 2: Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie einer typischen Jodierung nach der Chloramin T Methode.
AV = Ausschußvolumen

4.4. Isolierung und Präparation der Lebermikrosomen aus Rattenleber

Zur Verwendung kamen Ratten des Stammes: Sprague-Dawley, Süddeutsche Versuchstierfarm, Tuttlingen, und aus hauseigener Weiterzucht beiderlei Geschlechts. Das Gewicht der Tiere war von Versuch zu Versuch unterschiedlich und lag in der Regel über 200 g. Entsprechend schwankte auch das Lebergewicht. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere ca. 12 Stunden nüchtern gesetzt. Die Leberentnahme erfolgte unmittelbar nach Dekapitation der Tiere. Alle Präparationsschritte erfolgten bei 4° C.

Mikrosomen aus diesem Gewebe werden nach der Methode von Cuatrecasas (13,14), modifiziert nach Koch (55) präpariert. Für meine Versuche wurden jeweils zwei Lebern benötigt, die sofort nach Entnahme auf einer Glasplatte (eisgekühlt) gevierteilt und gemischt wurden. Das Gewebe wurde dann zu gleichen Teilen in 4 verschiedene Homogenisationsmedien gegeben. Das Gewicht der Leberportionen lag zwischen 2,0 und 6,8 g (vgl. Versuchsdaten Kap. 5.5. - Kap. 5.12.). Drei Homogenisationsmedien enthielten jeweils die an späterer Stelle beschriebenen Hemmstoffe, ein Medium (Kontrolle) bestand immer nur aus 0,25 M Sucrose/ 0,01 M KNaPP pH 7,4. In diesen Medien wurde das Gewebe nach Zerkleinern mit der Schere im 30 ml Glas-Teflon-Potter S homogenisiert:

5 x bei 250 rpm
3 x bei 500 rpm
3 x bei 1 000 rpm
3 x bei 1 500 rpm
und 5 x bei 2 000 rpm.

Jedes Homogenat wurde anschließend 10 Min. bei 600 g (WKF-Rotor 6 x 250 ml, 3 000 rpm) zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstandes und Verwerfen des Pellets wird dieser nochmals 30 Min. bei 13 500 g (WKF-Rotor 6 x 250 ml, 14 500 rpm) zentrifugiert. Wieder verwirft man das Pellet und zentrifugiert den Überstand nach Abdekantieren bei 105 000 g (Beckmann-Rotor Ti 60, 38 000 rpm). Das jetzt erhaltene mikrosomenhaltige Pellet suspendiert man in 0,01 M KNaPP pH 7,4 (Kontroll-Präparation) bzw. 0,01 M KNaPP pH 7,4 + jeweiligem Hemmstoff und zentrifugiert die Suspension bei 38 000 g (WKF-Rotor 8 x 50 ml, 20 000 rpm) 60 Min. lang. Dieser Waschchritt wurde zu Beginn der Arbeit zweimal, später nur noch einmal durchgeführt. Die eingesetzten HMP- und Waschpuffer-Volumina variierten zwischen 25 und 30 ml bzw. zwischen 20 und 30 ml. Das zuletzt erhaltene Pellet mit Mikrosomengewichten zwischen 80 und 1 165 mg (siehe jeweils Kap. 5.5. - 5.12.) wird in 0,01 M KNaPP pH 7,4 bzw. 0,01 M KNaPP pH 7,4 + Hemmstoff mit einem 20 ml Glas-Potter resuspendiert und bei - 30° C gelagert.

4.5. Extraktion des Rezeptors mit Triton-X-100

Zur Extraktion membranständiger Proteine bedient man sich der von Koch (56) modifizierten Methode von Cuatrecasas (13,14). Die nach 4.4. isolierten Mikrosomen verdünnt man zunächst mit 0,01 M KNaPP pH 7,4 bzw. 0,01 M KNaPP pH 7,4 + Hemmstoff derselben Konzentration wie im Waschpuffer bis zu einer Proteinkonzentration unter 20 mg/ml. Dieser Schritt entfiel in den meisten Fällen, da der Proteingehalt der Mikrosomenstammlösung (vgl. Versuchsdaten Kap. 5.5. - 5.12.) unter diesem Wert lag. Dieser Mikrosomensuspension wird 24 % Triton-X-100 bis zu einer Endkonzentration von 1,2 % (v/v) zugegeben und bei Raumtemperatur (24° C) 60 Min. lang gerührt.

Ansatz: 3 ml Mikrosomensuspension (Proteinkonzentration wie in Kap. 5.5. - 5.12. jeweils angegeben)

150 µl 24 % Triton-X-100.

Danach verdünnt man weiter auf 0,3 % Tritongehalt, 1 Volumen mit 3 Volumina kaltem 0,01 M KNaPP pH.7,4 ohne / mit Hemmstoff (Waschpufferkonzentration). Die ungelösten Bestandteile werden bei 38 000 g (WKF-Rotor 8 x 50 ml, 20 000 rpm) 90 Min. abzentrifugiert. Nach vorsichtigem Abpipettieren des LM-Extrakts werden 2 ml wiederum mit 4 ml 0,01 M KNaPP pH 7,4 mit / ohne Hemmstoff (Waschpufferkonzentration) verdünnt. Diesen 0,1 %igen sowie den 0,3 %igen Tritonextrakt lagert man bei - 30° C.

4.6. Proteinbestimmungen

4.6.1. Proteinbestimmung nach Lowry

Die routinemäßige Proteinbestimmung der Mikrosomensuspensionen wurde nach Lowry et al. (66) in der Ausführung von Richterich (82) durchgeführt.

Man setzt folgende Lösungen an:

Folin-Gebrauchs-Lösung: 1 ml 1 % $CuSO_4$ x 5 H_2O in H_2O
1 ml 2 % KNaTartrat in H_2O
98 ml 2 % $NaCO_3$ in H_2O

Phenolreagenz: Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteau (Fa. Merck, Darmstadt, ca. 2 N) wird mit 0,1 N NaOH gegen Phenolphtalein titriert und auf 1 N eingestellt.

Zur Bestimmung werden zusammenpipettiert:

100 µl Probe (0,5 - 5 mg/ml Protein, versetzt mit SDS ad 2 %
2 ml Folin-Gebrauchs-Lösung

vortexen, 10 Min. stehen lassen.

200 µl Phenolreagenz

vortexen, 30 - 40 Min. stehen lassen.

Die Extinktion mißt man bei 578 nm und errechnet die Proteinkonzentration als mg Protein/ml. Als Leerwerte verwendet man die jeweiligen Probenpuffer, die wie die Proben selbst behandelt werden, als Standard mißt man BSA (1 mg/ml).

4.6.2. Proteinbestimmung nach Peterson

Tritonextraktionen und Proteinkonzentrationen unter 0,5 mg/ml werden nach der Methode von Peterson (75) bestimmt. Einzelheiten zur Durchführung beschreibt Jäck (45).

4.7. ^{125}J-Insulin-Bindungstest

Als Grundlage für Bindungstests dient die Methode von Cuatrecasas (14), modifiziert nach Koch (55).

4.7.1. Bindung von ^{125}J-Insulin an Mikrosomen

Alle Bindungstests dieser Arbeit erfolgten bei 4° C. Zur Ermittlung der spezifischen Bindung müssen Gesamtbindung und unspezifische Bindung getestet werden und voneinander subtrahiert werden. Die unspezifische Bindung erhält man durch Zugabe von 30 µg/ml nativem Insulin im Parallelansatz. Alle Ansätze werden als Doppelbestimmung durchgeführt.

Pro Ansatz wird eines der folgenden Pipettierschemata verwendet:

100 µl A14-^{125}J-Insulin (60 - 80 000 cpm) in 0,3 M KNaPP pH 8,2 / 0,1 % Triton-X-100

200 µl Mikrosomensuspension (Stammlösung, vgl. Versuchsdaten Kap. 5.5. - 5.12.)

oder

100 µl A14-^{125}J-Insulin (60 - 80 000 cpm) in 0,3 M KNaPP pH 8,2 / 0,1 % Triton-X-100

200 µl Mikrosomensuspension (Stammlösung)

10 µl NEM (90 mM in H_2O)

oder

100 µl A14-^{125}J-Insulin (60 - 80 000 cpm) in 0,01 M KH_2PO_4 pH 7,0 / 0,1 % Triton-X-100

200 µl Mikrosomensuspension (Stammlösung)

oder

100 µl A14-^{125}J-Insulin (60 - 80 000 cpm) in 0,01 M KH_2PO_4 pH 7,0 / 0,1 % Triton-X-100

200 µl Mikrosomensuspension (Stammlösung)

10 µl NEM (90 mM in H_2O)

sowie Parallelansätze zur Bestimmung der unspezifischen Bindung mit zusätzlich

10 µl natives Insulin (1 mg/ml in 0,01 M KNaPP pH 7,4 / 0,1 % Triton-X-100).

Um den Insulin-Rezeptor-Komplex von nicht gebundenem Insulin abzutrennen, werden nach Inkubationsende die Proben bei 4° C mit PEG gefällt.

In alle Ansätze pipettiert man dazu:

200 µl γ-Globulin (0,4 % in 0,01 M KNaPP pH 7,4 / 0,02 % NaN_3)

500 µl PEG (20 % in H_2O).

Die Proben werden kräftig gerührt (Vortex) und 10 Min. bei 4° C stehengelassen. Im Anschluß zentrifugiert man den Niederschlag bei 4 800 g (Heraeus Minifuge II, Tragringrotor, 5 500 rpm) 15 Min. ab. Der erhaltene Überstand wird abdekantiert und verworfen. Das Pellet wäscht man mit Wasser durch Auffüllen und wieder Abdekantieren. Die Radioaktivität wird anschließend im Gammacounter bestimmt. Die Menge des spezifisch gebundenen A14-^{125}J-Insulins wird durch Subtraktion der unspezifisch gebundenen Menge von der Gesamtbindung bestimmt. Die Angabe erfolgt in Prozent der eingesetzten Radioaktivität.

4.7.2. Bindung von ^{125}J-Insulin an solubilisierten Rezeptor

Bindungsstudien an solubilisiertem Rezeptor verlaufen analog der Bestimmung an Mikrosomen.
Anstelle der Mikrosomensuspension werden in diesem Fall

200 µl Tritonextrakt (0,1 % an Triton, vgl. Kap. 4.5.)

eingesetzt.

4.8. Bestimmung des Insulinabbaus

Die Bestimmung insulinabbauender Aktivitäten erfolgt nach der Methode von Koch (55). Die Methode wurde in dieser Arbeit dahingehend erweitert, daß entnommene Aliquots aus den einzelnen Präparationsschritten (Homogenat, Überstand nach 1., 2. und 3. Zentrifugation) mit ausgetestet wurden.

Pipettiert werden im Einzelnen:

100 µl A14-^{125}J-Insulin (60 - 80 000 cpm) in 0,1 M KNaPP pH 7,4 / 0,1 % Triton-X-100

200 µl Mikrosomensuspension (Stammlösung, vgl. Versuchsdaten Kap. 5.5. - 5.12.) bzw. Homogenat bzw. cytosolischer Überstand.

In einen Parallelansatz pipettiert man zusätzlich:

10 µl NEM (90 mM in H_2O).

Inkubiert wird 20 - 60 Std. bei 4° C. Die Fällung der Proben erfolgt nach Inkubationsende durch Zugabe von 1 ml BSA (1 % in H_2O, eiskalt) und 1 ml TCA (10 % in H_2O, eiskalt). Die kräftig gerührten Proben (Vortex) bleiben 10 Min. bei 4° C stehen, bevor sie mit 4 800 g (Heraeus Minifuge II, Tragringrotor, 5 500 rpm) 15 Min. lang zentrifugiert werden. Ausgezählt wird im Gammacounter der Überstand nach Abdekantieren. Die Angabe des Insulinabbaus erfolgt in cpm (TCA-löslich) oder in % Abbau = cpm (TCA-löslich) / cpm (gesamt). Korrigiert werden die Angaben durch die entsprechende TCA-Löslichkeit des eingesetzten A14-^{125}J-Insulin in entsprechender Menge des jeweiligen Puffers.

4.9. Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors

Die Insulinrezeptoren der Mikrosomen werden nach der Methode von Klotz (53) mit $N^{\varepsilon B29}$-Mono-(4-Azidobenzoyl)-^{125}J-Insulin (^{125}J-MABI) photoaffinitätsmarkiert.

Dazu pipettiert man im Dunkeln bei 4° C:

150 µl 0,3 M KNaPP pH 8,2 / 3 % BSA

300 µl Mikrosomensuspension (1 - 1,5 mg Protein/ml)

x µl ^{125}J-MABI
(x ≙ den gewählten cpm, die in dieser Arbeit unterschiedlich hoch waren; i.d.R. über 1,8 Mio.).

Einem parallelen Ansatz werden noch

8 µl NEM (90 mM in H_2O)

zugesetzt.

Nach kräftigem Vortexen werden zur Ermittlung der unspezifischen Markierung aus jedem Ansatz

200 µl (s.o.) entnommen und

7 µl natives Insulin (1 mg / ml) in 0,01 M KNaPP pH 7,4 / 0,03 % Triton-X-100

zugefügt und erneut gerührt.

Nach ca. 30 Std. Inkubation bei 4° C im Dunkeln werden die Proben unter Eiskühlung 15 Min. lang aus einer Entfernung von 12 cm Abstand durch ein Duranglas hindurch mit UV-Licht (UV-Lampe Philips HPK, 125 W) bestahlt. Die photolysierten Proben versetzt man dann mit 1 ml 0,01 M KNaPP pH 7,4 und zentrifugiert 15 Min. lang bei 9 500 g (Servall-Rotor SS 34, 11 000 rpm). Nach Abdekantieren und Verwerfen des Überstandes zählt man das Pellet im Gammacounter aus und solubilisiert es mit 2-fach konzentriertem Probenpuffer (vgl. Kap. 4.10.1.) im Verhältnis 1 : 1.

Die Insulinrezeptoren nach Tritonextraktion werden in ähnlicher Weise markiert.

Im Einzelnen pipettiert man:

150 µl 0,3 M KNaPP pH 8,2
300 µl Tritonextrakt (0,1 % an Triton, vgl. Kap. 4.5.)
x µl ^{125}J-MABI
(x ≙ den gewählten cpm, i.d.R. 2,5 Mio.).

Die weiteren Schritte entsprechen bis auf die Zugabe von 1 ml 0,01 M KNaPP pH 7,4 und der Zentrifugation der photolysierten Proben denen der Mikrosomenmarkierung. Zur Ermittlung des Photolyseerfolges bei Tritonextraktionen werden Aliquots aller Proben nach der Photolyse entnommen und PEG gefällt.

4.10. Elektrophoresen

Zur Trennung von Proteinen können verschiedene Elektrophoreseverfahren angewendet werden. Drei häufig verwendete seien als Beispiel genannt:

1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) nach Laemmli (63)

   a) auf homologen Trenngelen
   b) auf Trenngelen mit einem linearen Gradienten

   zur Trennung nach dem Molekulargewicht.

2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen (SDS-PAGE) nach Fairbanks (26)

   ebenfalls zur Trennung nach dem Molekulargewicht

3. Polyacrylamidgelelektrophoresen (PAGE) nach Davis (17)

   zur Trennung nach Ladung.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen mit dem diskontinuierlichen System nach Laemmli auf Trenngelen mit einem linearen Gradienten an Acrylamid von 4 - 12 % und einer Acrylamidkonzentration der Sammelgele von 3,5 % verwendet. Das Verhältnis Acrylamid zu Bis betrug immer 100 : 2,68.
Die für die Gele verwendeten Glasplatten wurden vor Gebrauch über Nacht in 5 % Decon 90 gereinigt.

4.10.1. Probenvorbereitung

Proben für die SDS-PAGE, deren Proteingehalt nicht größer als 30 mg/ml sein sollte, versetzt man 1 : 1 mit Probenpuffer (2-fach konzentriert) und kocht diese 2 Min. bei 100° C. Proben, die reduziert werden sollen, versetzt man vor dem Kochen zusätzlich mit 20 mM DTE.

Den Probenpuffer setzt man 2-fach konzentriert an:

10 % SDS
20 % Glycin
0,125 M TRIZMA BASE/HCL pH 6,8
10 mM EDTA-Na_2
0,002 % Bromphenölblau.

4.10.2. Durchführung der Elektrophoresen

Stammlösungen:

- Trenngelpuffer (4-fach konzentriert)

  1,5 M Tris/HCL pH 8,7 (TRIZMA 8,7 preset)
  0,4 % SDS

- Sammelgelpuffer (4-fach konzentriert)

  0,5 M TRIZMA BASE/HCL pH 6,8
  0,4 % SDS

- Acrylamid-Stammlösung in H_2O

  40 % Acrylamid
  1,07% Bis

- Ammoniumpersulfat (100-fach konzentriert)

  100 mg/ml Ammoniumpersulfat in H_2O

- Elektrodenpuffer

  0,025 M Tris (TRIZMA BASE/HCL)
  0,192 M Glycin
  0,1 % SDS

Zum Gießen eines Trenngels (180 x 140 x 1,5 mm) mit linearem Gradienten von 4 - 12 % Acrylamid werden 20 ml 4 % Acrylamid / 0,107 % Bis in Trenngelpuffer und 20 ml 12 % Acrylamid / 0,321 % Bis in Trenngelpuffer angesetzt. Im Gradientenmischer fügt man jeweils 200 µl Ammoniumpersulfat-

lösung und 10 µl TEMED hinzu. Der im Mischer erzeugte Gradient sollte in weniger als 5 Min. zwischen die Glasplatten gegossen und sofort mit Trenngelpuffer überschichtet werden. Nach Auspolymerisieren der Gele, was bei Raumtemperatur ca. 30 Min. in Anspruch nimmt, wechselt man den Überschichtungspuffer aus. In der Regel werden die Gele über Nacht stehen gelassen. Vor Aufgießen des Sammelgels entfernt man den Trenngelpuffer sorgfältig. Für das Sammelgel wird folgende Lösung angesetzt:

10 ml 3,5 % Acrylamid / 0,093 % Bis in Sammelgelpuffer
100 µl Ammoniumpersulfatlösung
5 µl TEMED.

Ist die Polymerisation des Sammelgels nach 30 - 40 Min. abgeschlossen, entfernt man die eingesetzten Kämme und spült die Taschen vor Auftragen der Proben mit Elektrodenpuffer. Aufgetragen werden pro Tasche 50 µl Probe mit einem Proteingehalt von ca. 50 µg. Die Laufdauer beträgt bei konstanter Stromstärke von 36 mA pro Gel ca. 5 Std.

4.10.3. Färben von Gelen und Autoradiographie

Färbelösungen nach Fairbanks (26) enthalten:

0,025 % Coomassie Blue R 250
25 % Isopropanol
10 % Essigsäure.

Die Gele der SDS-PAGE werden über Nacht in obiger Lösung gefärbt und anschließend in Entfärbelösung (10 % Essigsäure/ 10 % Methanol) durch Diffusion wieder entfärbt. Das Entfärbebad muß dabei öfters gewechselt werden. Das Trocknen der Flach-Gele erfolgt unter Wasserstrahlvakuum (2 Std. bei 90° C). Autoradiographiert wird mittels KODAK X-OMAT-AR Film (20 x 25 cm) 3 - 5 Tage in Kassetten bei - 80° C. Entwickelt und fixiert werden die Filme nach Vorschrift des Herstellers mit Adefo Röntgen Rapid-Entwickler und Adefo Röntgen Rapid-Fixierer.

4.10.4. Molekulargewichtsbestimmung mittels SDS-PAGE

Die Molekulargewichtsbestimmung des photoaffinitätsmarkierten Rezeptors und seiner Untereinheiten erfolgte durch Elektrophoresen nach Laemmli wie in 4.10. beschrieben. Dazu wurden neben den Proben Molekulargewichtsstandardproteine mit elektrophoretisiert.

Es wurden folgende Proteine verwendet:

Spectrin I	MG 240 000	Phosphorylase b	MG 94 000
Spectrin II	MG 220 000	BSA	MG 68 000
Myosin	MG 205 000	Katalase	MG 60 000
RNA-Polymerase ß	MG 165 000	Ovalbumin	MG 43 000
RNA-Polymerase ß'	MG 155 000	Aldolase	MG 40 000
RNA-Polymerase	MG 39 000	ChymotrypsinogenMG	21 500
ß-Galaktosidase	MG 116 000		

Behandlung des MG-Standards:

Je 20 µl RNA-Polymerase (Orginalsuspension von Boehringer, Mannheim), Aldolase (2 mg/ml), Ovalbumin (4 mg/ml), Katalase (1 mg/ml), BSA (2 mg/ml), Chymotrypsinogen (2 mg/ml), 60 µl Myosin (2 mg/ml) und 100 µl Spectrin (Orginallösung nach Kelm (52)) werden zusammen mit 40 µl Mercaptoäthanol und 375 µl Probenpuffer 2-fach konzentriert (vgl. Kap. 4. 10.1.) 5 Min. bei 100° C gekocht. Anschließend dialysiert man das Gemisch 2 mal gegen 1 l 0,01 M KNaPP pH 7,4 / 0,1 % SDS (1 mg/ml) / 3 mM NEM (375 mg/ml) und 1 mal gegen dasselbe Medium, allerdings ohne NEM bei Raumtemperatur. Anschließend wird dem Dialysat die gleiche Menge (v/v) Probenpuffer (2-fach konzentriert) zugesetzt.

Nach Färben, Trocknen und Autoradiographieren der Elektrophoresegele bestimmt man die R_f-Werte der Standardproteine und der Rezeptorbanden, wobei der R_f-Wert der Elektrophoresen nach Laemmli als Quotient aus Laufstrecke der Proteinbande und der Laufstrecke der Bromphenolblau-Bande definiert ist. Durch Auftragen von log MG gegen den R_f-Wert erhält man die Eichgerade, mittels derer log MG der Rezeptorbanden bestimmt werden kann.

5. ERGEBNISSE

5.1. Einfluß der getesteten Substanzen auf den ^{125}J-Insulinabbau

Rattenlebermikrosomen, ebenso wie Tritonextrakte daraus, besitzen selbst bei 4° C noch beträchtliche Insulinabbauaktivität.
Um die spezifische Insulinbindung der einzelnen Versuche beurteilen zu können, die bei hohen Abbauraten fälschlicherweise zu niedrig ausfällt, wurden zu allen Versuchen Abbautests gemacht. Der Insulinabbau wurde, wenn nicht anders angegeben, mit 1/5 der in Kap. 5.5. - 5.12. jeweils angegebenen Proteinkonzentration und der ebenfalls in diesen Kapiteln angegebenen Inhibitorkonzentration des Waschpuffers bestimmt. Es wurden dabei nur Mikrosomen, keine TEX ausgetestet.
Bei den Ergebnissen ist zu beachten, daß immer nur der Hemmstoffversuch mit seinem jeweiligen Vergleichswert betrachtet werden darf, da Schwankungen der auf den Test einflußnehmenden Faktoren wie Präparations- und Inkubationsdauer, Lagerzeit bei - 30° C, Alter des ^{125}J-Insulins u.s.w. nicht auszuschließen waren.

Gute Abbauinhibierung zeigten dabei:

N-Ethylmaleinimid (3 mM), p-Chlormercuribenzoesäure, Na-Salz (0,03 mM), Jodacetamid (3 mM), Kupfersulfat (0,01 mM), 2,6-Dichlorphenol-indophenol, Na-Salz (3 mM), Glutathion, oxidiert (3 mM), 1,10-Phenanthroliniumchlorid (2 mM), Methylenblau (0,1 mM), N-Methylphenazin-Methylsulfat (3 mM), Phenylmethylsulfonylfluorid (1 mM), Kalium-Eisen(III)-Cyanid (3 mM) und Bacitracin (2 mM).

Wie in Kap. 4.8. beschrieben, wurde der Abbau zusätzlich im Verlauf der gesamten Mikrosomenpräparation durch Entnahme von Aliquots überprüft und zwar jeweils in Ab- und Anwesenheit von NEM (3 mM). Das wichtigste Ergebnis aus

den sonst nicht gezeigten Untersuchungen war, daß NEM-Zugabe in obiger Konzentration auf jeder Präparationsstufe, auch im unverdünnten Homogenat bzw. in den cytosolischen Überständen den Insulinabbau nahezu vollständig zu inhibieren vermag. Mit 1,10-Phenanthroliniumchlorid (2 mM) konnte der Abbau auf jeder Präparationsstufe zu ca. 50 % verhindert werden.

5.2. Einfluß der getesteten Substanzen auf die ^{125}J-Insulinbindung an den Rezeptor

Eine wesentliche Voraussetzung bei der Festlegung der Hemmstoffkonzentrationen stellte der Einfluß der Substanzen auf die spezifische Bindung von ^{125}J-Insulin dar. Entsprechend Kap. 4.7. - 4.7.2. wurden deshalb Bindungstests unter verschiedenen Pufferbedingungen (Bedingung I = 0,1 M KNaPP pH 8,0, Bedingung II = 0,01 M KNaPP pH 7,0) jeweils mit bzw. ohne Hemmstoffzusatz und in Ab- und Anwesenheit von NEM (3 mM) durchgeführt. Die Bindung wurde mit 1/5 der in den Kap. 5.5. - 5.12. angegebenen Proteinkonzentration und den in diesen Kapiteln jeweils angegebenen Inhibitorkonzentration des Waschpuffers ausgetestet. Bindungsstudien mit TEX wurden nicht gemacht. Da die Tests mit NEM, außer der bekannten negativen Beeinflussung der spezifischen Bindung, die unter Bedingung I größer als unter Bedingung II ausfällt, zu keiner weiteren relevanten Aussage führten, werden sie nicht mehr gesondert aufgeführt. Auch für die Austestung der Bindung gilt, daß bei der vergleichenden Betrachtung korrekterweise nur der einzelne Hemmstoffversuch mit seinem Vergleichswert als Einheit gesehen werden darf. Prinzipiell fielen die Werte für die spezifische Bindung in den hemmstoffhaltigen Proben niedriger aus als bei den Vergleichswerten. Für Kupfersulfat war unter Bedingung II überhaupt keine spezifische Bindung mehr meßbar. Eine Ausnahme bildeten: Glutathion, reduziert, 2,6-Dichlorphenol-indophenol, Na-Salz, Methylenblau, Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan und Albumin; hier wurden höhere

Werte gefunden. Diese Werte müssen jedoch kritisch betrachtet werden, da erstens die Erhöhung bei GSH und DCIP nur geringfügig ist, zweitens sich die Proteinbestimmung für den Methylenblau- und Albuminversuch schwierig gestaltete und mit Sicherheit diesbezüglich Ungenauigkeit aufweist und drittens im Widerspruch zu u.a. von Koch (56) gefundenen Ergebnissen steht. Im Bezug auf unterschiedlich gefundenes Bindungsverhalten für Tris, siehe Kelm (52).

5.3. Photoaffinitätsmarkierung und SDS-PAGE

Für die Analyse des spezifisch markierten Insulinrezeptors mittels SDS-PAGE ist es notwendig, den zuvor nicht kovalent gebundenen Insulin-Rezeptor-Komplex, der unter dem Einfluß von SDS dissoziieren würde, kovalent zu binden. Hier wurde dies durch Photoaffinitätsmarkierung erreicht (vgl. Kap. 4.9.). Das photoreaktive Insulinderivat MABI enthält eine Azidobenzoylgruppe, die unter Einwirkung von UV-Licht N_2 abspaltet. Die entstehende Nitrenfunktion ist stark elektrophil. Wird ^{125}J-MABI vor der Belichtung nichtkovalent an den Insulinrezeptor gebunden, so reagiert die Nitrenfunktion mit benachbarten Gruppen am Insulinrezeptor, sodaß eine kovalente Bindung zwischen Rezeptor und ^{125}J-Insulin-Derivat entsteht. Zur Bestimmung unspezifisch markierter Proteine werden im parallelen Ansatz Proben in Anwesenheit von nativem Insulin photoaffinitätsmarkiert. In einem weiteren Parallelansatz wurde den Proben zur Abbauhemmung noch NEM (3 mM) zugesetzt. Alle Proben wurden auf vergleichbare Radioaktivität eingestellt und unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen elektrophoretisiert (vgl. Kap. 4.10.). Nach Anfärben der Banden mit Coomassie Blue R-250 wurden die Gele getrocknet und autoradiographiert (vgl. Kap. 4.10.3.). Die Ergebnisse der SDS-PAGE-Analyse werden in den nachfolgenden Kapiteln im einzelnen gezeigt. Zur Darstellung kommen jedoch nur die spezifischen, ohne Zusatz von NEM erhaltenen Bandenmuster des Rezeptors. Die mit NEM photolysierten Proben zeigten

nämlich ein durchgehend einheitliches Muster wie in Kap. 5.5.1. exemplarisch dargestellt. So zeigten sich bei allen nichtreduzierten Proben mit NEM-Zusatz immer nur drei Hauptbanden während es sonst i.d.R. sechs waren.

5.4. Molekulargewichtsbestimmung des Rezeptors und seiner Untereinheiten

Wie in Kap. 4.10.4. beschrieben, wurde für jedes Gel zur Ermittlung der Molekulargewichte der Rezeptorbanden anhand der elektrophoretisierten Standardproteine eine Eichgerade erstellt. Dazu trägt man die R_f-Werte dieser Proteine gegen log MG auf. Die ermittelten Eichgeraden aus verschiedenen Gelen zeigten gute Übereinstimmung. Die Abb. 3 zeigt eine typische Eichgerade des verwendeten Elektrophoresesystems.

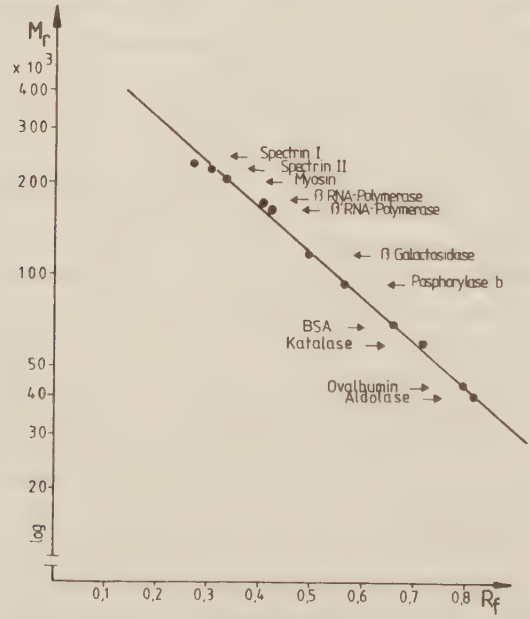


Abb. 3: Typische Eichgerade von SDS-PAGEn nach Laemmli auf diskontinuierlichen Gelen mit einer Acrylamidkonzentration von 4 - 12 % und Molekulargewichtstandards nach Kap. 4.10.4.

Die so erhaltenen Molekulargewichte der spezifisch markierten Rezeptorbanden sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Bande	MG	Streuung
1	428 000	± 14 000
2	384 000	± 14 000
3	342 000	± 14 000
4	309 000	± 11 000
5	256 000	± 7 000
6	218 000	± 4 000
r1	133 000	± 8 000
r2	115 000	± 5 000

Tab. 1: Molekulargewichte der Insulinrezeptorbanden, bestimmt von SDS-PAGEn nach Laemmli gemäß Kap. 5.4.

Die Banden 1 - 6 werden unter nicht reduzierenden Bedingungen gefunden. Gelegentlich zeigte sich noch eine 7. und 8. Bande im Bereich von MG 170 000 bzw. MG 125 000. r1 und r2 sind Banden, die nach Reduktion der Proben mit 20 mM DTE zur Darstellung kommen. Trotz Reproduzierbarkeit sind diese MG-Werte mit Vorsicht zu betrachten; denn es ist bekannt, daß hydrophobe Membranproteine, Glykoproteine und Proteine mit inter- und intrachenaren Disulfidbindungen und somit auch der Insulinrezeptor auf SDS-PAGEn atypisches Laufverhalten zeigen (29,77) und mit den globulären ideal laufenden Standardproteinen nur eingeschränkt zu vergleichen sind. Die noch besten Ergebnisse werden bei Verwendung von Gradientengelen erzielt. Hier wurden für die Trennstrecke eine Acrylamidkonzentration von 4 - 12 % gewählt. Zur Gesamtproblematik der MG-Bestimmung siehe Koch et al. (58). Die unter den jeweiligen Versuchsbedingungen gefundenen Banden werden in ihrer relativen Intensität in den einzelnen Kapiteln graphisch zur Anschauung gebracht.

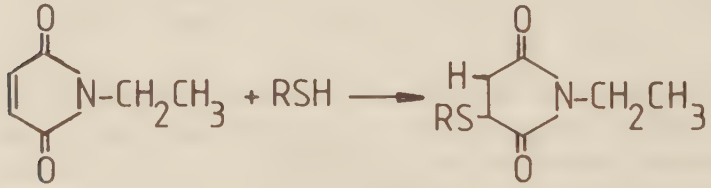
5.5. Hemmstoffe von SH-Gruppen tragenden Enzymen

Getestet wurden: N-Ethylmaleinimid, Chlormercuribenzoesäure Na-Salz, Jodacetamid, Kupfersulfat und Cytochalasin B

Hemmstoffe dieser Wirkweise wurden gewählt, da bei sehr vielen Enzymen SH-Gruppen im aktiven Zentrum für die katalytischen Prozesse verantwortlich sind. Als spezifische Gruppenreagenzien wurden alle getesteten Substanzen bereits bei Insulinabbaustudien eingesetzt.

5.5.1. N-Ethylmaleinimid (NEM)

MG: 125.13
Strukturformel:



Kenntnisse um die schnelle Reaktion der SH-Gruppen von Mercaptoessigsäure und Glutathion mit Maleinimid und N-Ethyl-Maleinimid gehen auf spektrometrische Studien von Friedmann u.a. (31,32) zurück. Diese Reaktion produzierte verschiedene unbekannte Produkte, deren Entdeckung weitere Untersuchungen zur Identifizierung und Aufklärung ähnlicher Produkte, anderer Aminosäuren und Proteine, anregte. Viele dieser Nachforschungen dienten in erster Linie dazu, optimale Bedingungen für den Einsatz von NEM zur Bestimmung von SH-Gruppen zu schaffen. Als Substanz, die sowohl die Fähigkeit besitzt, Proteasen mit SH-Funktionen im aktiven Zentrum als

auch freie SH-Funktionen, die für die Glutathion-Transhydrogenase-Aktivität notwendig sind zu blockieren, wird NEM seit langem als Insulinabbauinhibitor eingesetzt. 100 % Inhibition wurde beschrieben (73).

Versuchsdaten:

HMP: 10 mM NEM

Waschpuffer und TEX: 3 mM NEM

	Vergleichswert:	NEM
Lebergewicht:	5,10 g	4,90 g
Mikrosomengewicht:	521 mg	519 mg
Proteingehalt:	8,22 mg/ml	8,10 mg/ml
Insulinabbau:	17 % TCA-lös.	1 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 8,0	19,9 %	14,1 %
0.01 M/ pH 7,0	9,7 %	4,8 %

Abb. 4:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff NEM: spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
– / + Reduktion

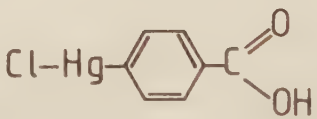
b ≙ Hemmstoffversuch mit NEM (Mikrosomen)
– / + Reduktion

Das spezifische Bandenmuster des Insulinrezeptors für Tritonextrakt ± Reduktion ist praktisch mit dem für Lebermikrosomen identisch und wird daher nicht extra gezeigt. Im Hemmstoffversuch sieht man im nicht reduzierten Zustand nur Bande 1,2,3 und schwach 6 mit einer erhöhten relativen Intensität der Bande 2 und einer Abschwächung der Bande 3 und 6. Im Gegensatz zum Vergleichswert zeigt sich im reduzierten Zustand auch Bande r2.

Das Bandenmuster dieses Hemmstoffversuchs ist außerdem exemplarisch für alle sonstigen, unter Zusatz von NEM durchgeführten, aber nicht gezeigten Versuche (vgl. Kap. 5.3.).

5.5.2. p-Chlormercuribenzoesäure, Na-Salz (pCMB)

MG: 379,2
Strukturformel:



pCMB ist ein synthetischer, chromophorer Stoff, der zur Markierung und Maskierung eingesetzt wird. Er reagiert unter Abspaltung von HCL mit Thiolresten. Durch Reaktion mit SH-Gruppen, die sich nicht im aktiven Zentrum befinden, kann es zur Konformations- und Stabilitätsänderung kommen, wodurch die Empfindlichkeit gegenüber anderen Einflüssen wie z.B. pH und Ionenstärke erhöht werden kann. Gleich NEM hat er sich als Insulinabbauhemmer bewährt.

Versuchsdaten:

HMP:	gesättigte Lösung (1 mM)
Waschpuffer und TEX:	0.03 mM pCMB

	Vergleichswert:	pCMB
Lebergewicht:	3,52 g	3,42 g
Mikrosomengewicht:	363 mg	329 mg
Proteingehalt:	5,2 mg/ml	3,7 mg/ml
Insulinabbau:	28,7 % TCA-lös.	1,4 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 8,0	19,1 %	17,4 %
0.01 M/ pH 7,0	11,4 %	5,9 %

pCMB wurde nochmals in gleicher Konzentration zusammen mit Tunicamycin und 2,3-Dehydro-2-desoxy-N-acetylneuraminsäure eingesetzt (vgl. Kap. 5.10.2.).

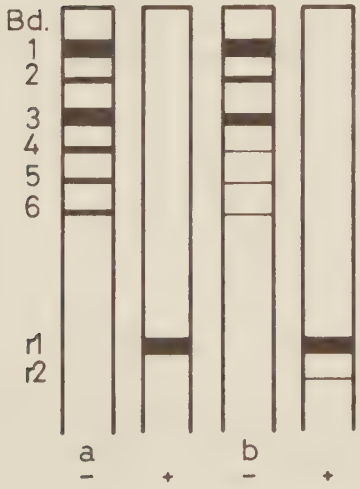


Abb. 5:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff pCMB: spezifische Rezeptorbanden

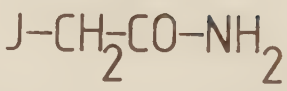
a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
− / + Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch mit pCMB (Mikrosomen)
− / + Reduktion

Auch bei diesen Versuchen zeigte sich ein für TEX und Lebermikrosomen identisches spezifisches Bandenmuster des Insulinrezeptors mit einer Abschwächung der Banden nach unten hin. Bande 4,5 und 6 des Hemmstoffversuchs sind nur noch andeutungsweise sichtbar. Im Gegensatz zum Vergleichswert taucht im pCMB-Versuch schwach die reduzierte Bande r2 auf.

5.5.3. Jodacetamid

MG: 185
Strukturformel:



Jodacetamid ist wie N-Ethylmaleinimid und p-Chlormercuribenzoesäure eine SH-Gruppen blockierende Substanz, die sich ebenfalls als Hemmstoff des Insulinabbaus bewährt hat. Mit diesem Inhibitor wurden zwei Versuche durchgeführt, wobei die Konzentrationen unterschiedlich hoch gewählt wurden und Jodacetamid einmal allein und einmal zusammen mit GSSG eingesetzt wurde.

Versuchsdaten:

HMP: 5 mM Jodacetamid

Waschpuffer und TEX: 3 mM Jodacetamid

	Vergleichswert:	Jodacetamid
Lebergewicht:	2,82 g	2,71 g
Mikrosomengewicht:	220 mg	233 mg
Proteingehalt:	2,4 mg/ml	1,9 mg/ml
Insulinabbau:	23 % TCA-lös.	1,1 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 8,0	11,5 %	7,9 %
0.01 M/ pH 7,0	4,3 %	3,5 %

HMP: 10 mM Jodacetamid/GSSG

Waschpuffer und TEX: 3 mM Jodacetamid/GSSG

	Vergleichswert:	Jodac./GSSG
Lebergewicht:	3,85 g	4,10 g
Mikrosomengewicht:	383 mg	405 mg
Proteingehalt:	5,64 mg	5,18 mg
Insulinabbau:	36 % TCA-lös.	11,1 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:	nicht bestimmt	

Abb. 6:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoffversuch mit Jodacetamid/GSSG: spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
  − + Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch (Mikrosomen)
  − + Reduktion

c ≙ Vergleichswert (Tritonextrakt)
  − + Reduktion

d ≙ Hemmstoffversuch (Tritonextrakt)
  − + Reduktion

Diese Bandenmuster stehen für den Jodacetamid/GSSG-Versuch. Beim Vergleichswert (LM) das schon bekannte Bild. Im Hemmstoffversuch (LM) deutliche Minimierung der Banden mit einer relativen Intensitätsverschiebung zur 1. Bande hin. Beim Triton-extrahierten Rezeptor teilt sich im nicht reduzierten Zustand die Bande 6 beim Vergleichswert in 6a und 6b auf und die relative Intensität verschiebt sich zu Gunsten der höhernumerierten Banden. Im Hemmstoffversuch (TEX) sind lediglich die Banden 1,2 und abgeschwächt 3 und 6b sichtbar. Beim Tritonextrakt dann auch sichtbar die reduzierte Bande r2, die bei den Versuchen mit Lebermikrosomen fehlt. Der in den Hemmstoffversuchen zu beobachtende Effekt ist wegen der Analogie von Jodacetamid zu NEM höchstwahrscheinlich auf diese Substanz zurückzuführen.

5.5.4. Kupfersulfat

MG: 249,68
Strukturformel:

Analog zu den vorgenannten SH-Hemmstoffen wurde auch $CuSO_4$ eingesetzt. Kupfersulfat reagiert in gleicher Weise wie pCMB (vgl. Kap. 5.5.2.) mit SH-Gruppen.

Versuchsdaten:

HMP:	0,05 mM $CuSO_4$
Waschpuffer und TEX:	0,01 mM $CuSO_4$

	Vergleichswert:	$CuSO_4$
Lebergewicht:	3,07 g	2,7 g
Mikrosomengewicht:	296 mg	304 mg
Proteingehalt:	4,0 mg/ml	4,1 mg/ml
Insulinabbau:	18,9 % TCA-lös.	0,9 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 8,0	18,1 %	1,9 %
0.01 M/ pH 7,0	7,1 %	---

Abb. 7:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff $CuSO_4$: spezifische Rezeptorbänden

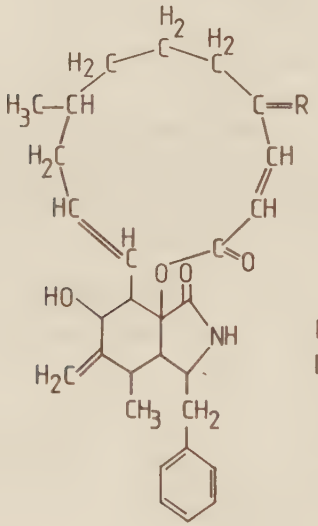
a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
– / + Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch mit $CuSO_4$ (Mikrosomen)
– / + Reduktion

Der Vergleichswert (LM) zeigt Bande 1 - 5 und r1 sowie andeutungsweise die Bande 6. Im Hemmstoffversuch (LM) sind nur noch die Banden 1 - 3 und ebenfalls andeutungsweise die Bande 6 sichtbar. r1 ist auch hier im reduzierten Zustand deutlich zu erkennen. Die sonst gefundene zweite Bande r2 im DTE-reduzierten Zustand fehlt.

5.5.5. Cytochalasin B

MG: 479,5
Strukturformel:



Cytochalasin B ist ein Metabolit des Pilzes Helminthosporium dematoiderum. Zu den von dieser Substanz beeinflußten Aktivitäten gehören Phagocytose, Pinocytose, Cytokinese, Exocytose u.a. von Zellen und Organellen (64).
Durch reversible Hemmung der Transglucosamidase und Transgalaktosidase werden Mucopolysaccharide und Glycoproteinsynthese beeinflußt (85).
Wie aus obiger Strukturformel ersichtlich, enthält Cytochalasin B reaktive Gruppen, die möglicherweise für eine Hemmung SH-Gruppen tragender Enzyme in Frage kommen. Im Zusammenhang mit Rezeptoreffekten siehe auch (79).

Versuchsdaten:

HMP: 10 µg/ml Cytochalasin B

Waschpuffer und TEX: 10 µg/ml Cytochalasin B

	Vergleichswert:	Cytochalasin B
Lebergewicht:	2,89 g	3,22 g
Mikrosomengewicht:	176 mg	318 mg
Proteingehalt:	3,1 mg/ml	2,1 mg/ml
Insulinabbau:	46,1 % TCA-lös.	43,8 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:	nicht bestimmt	

Abb. 8:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff Cytochalasin B: spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
– / + Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch mit Cytochalasin B (Mikrosomen)
– / + Reduktion

Das spezifische Insulinrezeptorbandenmuster der Versuche mit Lebermikrosomen ist beim Vergleichswert und im Hemmstoffversuch übereinstimmend. Übereinstimmend ist auch das Bandenmuster von TEX-Vergleichswert und TEX-Hemmstoffversuch und bis auf das zusätzliche Auftauchen der reduzierten Bande r2 bei den Tritonextrakten sind diese identisch mit den Mikrosomenbanden, weshalb sie nicht extra gezeigt werden.

Bewertung:

Die Hemmstoffe dieser Gruppe nahmen mit Ausnahme von Cytochalasin B hauptsächlich Einfluß auf die spezifischen Rezeptorbanden 3,4,5 und 6. Die Entstehung der Bande 3 wurde teilweise, die der Banden 4 und 5 in der Regel gänzlich verhindert. Bande 6 erschien jeweils deutlich schwächer. Das heißt, daß SH-Gruppen den Rezeptor reduzieren und für die Entstehung der niedermolekularen Banden verantwortlich sind.

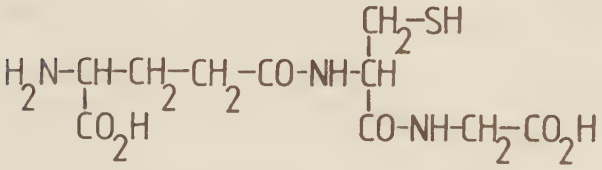
5.6. Redoxreagenzien

Getestet wurden: Glutathion reduziert, Glutathion oxidiert, 2,6-Dichlorphenol-indophenol, Kalium-Eisen(III)-Cyanid, Phenazin-Methosulfat, Methylenblau, 2,3,5-Triphenyl-tetrazolium-chlorid

In der Annahme, daß die Untereinheiten des Insulinrezeptors durch Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind und daß das Bandenmuster durch Reduktion dieser SS-Bindungen zustande kommt, wurden Substanzen dieser Wirkweise getestet. Oxidationsmittel müßten somit die Bandenentstehung verhindern, während Reduktionsmittel diesen Prozeß in umgekehrter Weise beschleunigen müßten. Der Angriff der Substanzen erfolgt dabei entweder direkt am Rezeptor oder durch Beeinflussung der aktiven Zentren bzw. der Kosubstrate von rezeptormodifizierenden Enzymen.

5.6.1. Glutathion, reduziert (GSH)

MG: 307,3
Strukturformel:



GSH ist ein Tripeptid von der Zusammensetzung L-γ-Glutamyl-L-Cysteyl-L-Glycin. Mit 0,1 - 10 mM ist der Gehalt an GSH in tierischen und pflanzlichen Zellen hoch und wichtig für die Spaltung von im Stoffwechsel gebildeten Peroxiden, bei zahlreichen Enzymreaktionen, für die Regulation von Stoff-

wechselvorgängen, die Einschleusung von Aminosäuren in die Zelle über den γ-Glutamyl-Zyklus, Entgiftungsvorgänge in der Zelle und die Freisetzung von Neurotransmittern. Durch reversible Oxidation der SH-Gruppen zweier GSH-Moleküle entsteht das über eine Disulfidbrücke verbundene Doppelmolekül des oxidierten Glutathions (GSSG). Oxidiertes und reduziertes GSH bilden in der Zelle ein wichtiges Redox-Paar, das für die Aufrechterhaltung des Redox-Zustandes der Zelle verantwortlich ist. Bei den Enzymen hat wesentliche biologische Bedeutung die Wechselwirkung mit anderen SH-Gruppen Enzymen (Formaldehyd-Dehydrogenase, Maleyl-Aceto-Acetat Isomerase, DDT-Dehydrochlorinase, Glyoxalase-System) und Strukturproteinen (6).

Versuchsdaten:

HMP: 3 mM GSH
Waschpuffer
und TEX: 1 mM GSH

	Vergleichswert:	GSH
Lebergewicht:	5,10 g	5,40 g
Mikrosomengewicht:	521 mg	662 mg
Proteingehalt:	8,22 mg/ml	7,71 mg/ml
Insulinabbau:	17,0 % TCA-lös.	32,6 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 8,0	19,9 %	21,7 %
0.01 M/ pH 7,0	9,7 %	8,6 %

Abb. 9:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoffversuch mit GSH: spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
– / + Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch (Mikrosomen)
– / + Reduktion

c ≙ Vergleichswert (Tritonextrakt)
– / + Reduktion

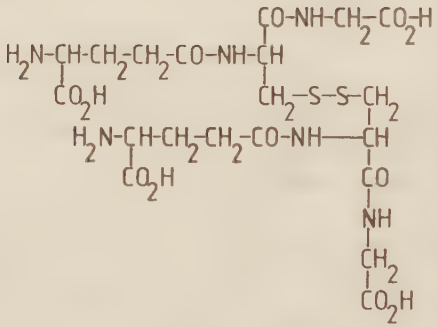
d ≙ Hemmstoffversuch (Tritonextrakt)
– / + Reduktion

Der autoradiographierte Rezeptor der Lebermikrosomen markiert die Banden 1 - 6 und r1. 1 und 3 sind dabei die am stärksten markierten Banden. Im Hemmstoffversuch mit Lebermikrosomen zeigen sich ebenfalls 6 Banden im nicht reduzierten und r1 und r2 im reduzierten Zustand. Die relative Intensität nimmt zu Gunsten der höhernumerierten Banden zu. Beim Triton-extrahierten Vergleichswert zeigt sich ein ähn-

liches Muster wie bei den Lebermikrosomen. Hier ist die Bande 6 jedoch aufgeteilt in 6a und 6b. Die relative Intensität ist ebenfalls zu den höhernumerierten Banden hin verschoben. Zudem findet man die beiden reduzierten Banden r1 und r2. Im Hemmstoffversuch (TEX) beobachtet man unter nicht reduzierenden Bedingungen die ansonsten nur unter reduzierenden Bedingungen sichtbaren Banden r1 und r2. Diese beiden Banden sieht man auch, wenn darüber hinaus mit DTE reduziert wird.

5.6.2. Glutathion, oxidiert (GSSG)

MG: 612,6
Strukturformel:



Wie in 5.6.1. beschrieben, stellt GSSG das Oxidationsprodukt von GSH dar und zusammen mit ihm ein wichtiges Redox-System der Zelle. Da GSH einer ständigen Oxidation unterliegt - in vitro verstärkt in Gegenwart von Eisen- und Kupfersalzen sowie nach Zusatz von Häminen (5), ist zur Aufrechterhaltung des hohen Reduktionsgrades eine schnelle Enzymreduktion mittels Glutathionreduktase erforderlich.

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{(GR)} 2\ GSH + NADP^+$$

NADPH wird durch den Hexose-Monophosphat-Zyklus bereitgestellt, der durch GSSG möglicherweise kontrolliert wird. GSSG ist im Gewebe nur in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar. Bei intrazellulärer Erhöhung des GSSG wird Enzymhemmung wie z.B. Hexokinase, saure Phosphatase und Veränderung der Eigenschaften des Hämoglobins angenommen.

Versuchsdaten:

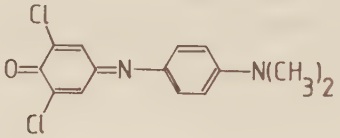
HMP: 10 mM GSSG
Waschpuffer
und TEX: 3 mM GSSG

	Vergleichswert:	GSSG
Lebergewicht:	2,77 g	2,73 g
Mikrosomengewicht:	264 mg	216 mg
Proteingehalt:	3,6 mg/ml	2,8 mg/ml
Insulinabbau:	23,6 % TCA-lös.	9,0 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 8,0	11,3 %	11,8 %
0.01 M/ pH 7,0	5,2 %	4,6 %

Für diesen Versuch ist keine Autoradiographie vorhanden. Ein zweiter Versuch, bei dem GSSG in gleicher Konzentration zusammen mit Jodacetamid eingesetzt wurde, siehe Kap. 5.5.3.

5.6.3. 2,6-Dichlorphenol-indophenol (DCIP)

MG: 290,1
Strukturformel:



DCIP ist ein Indophenolfarbstoff, der die Konstitution eines dichlorierten Hydroxyphenylchinonmonimins hat. Er wurde früher als Tillmanns Reagenz zur quantitativen Bestimmung der Ascorbinsäure verwendet. Als wirksames Oxidationsmittel, z.B. der Insulinprotease, wird DCIP zur Abbauhemmung von Insulin eingesetzt (7). Bei einer Konzentration von 1 mM wird der Abbau zu 45 % unterdrückt.

Versuchsdaten:

HMP: 5 mM DCIP
Waschpuffer
und TEX: 3 mM DCIP

	Vergleichswert:	DCIP
Lebergewicht:	4,1 g	3,8 g
Mikrosomengewicht:	403 mg	436 mg
Proteingehalt:	5,5 mg/ml	6,5 mg/ml
Insulinabbau:	22,6 % TCA-lös.	0,9 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 8,0	17,3 %	18,7 %
0.01 M/ pH 7,0	6,7 %	6,0 %

Abb. 10:
Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff DCIP: spezifische Rezeptorbanden

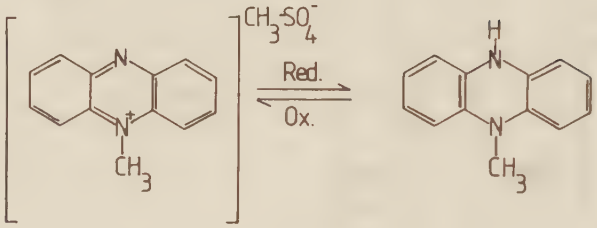
a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
– Reduktion
+

b ≙ Hemmstoffversuch mit DCIP (Mikrosomen)
+ Reduktion
–

Das spezifische Bandenmuster des Insulinrezeptors in Lebermikrosomen zeigt beim Vergleichswert die jetzt schon öfters gefundene Bandensequenz. Man sieht die Banden 1 - 6 und r1. Unter dem Einfluß des Oxidationsmittels DCIP wird die Entstehung der niedermolekularen Banden geblockt. Man findet nur 3 spezifische Hauptbanden im nicht reduzierten Zustand und angedeutet die Bande 6. Im reduzierten Zustand sieht man die Banden r1 und r2. Die relative Intensität der Banden des Hemmstoffversuchs ist zu den höhermolekularen hin verschoben. Das Rezeptorbandenmuster der Tritonextrakte gleicht dem aus Lebermikrosomen und wird deshalb nicht extra gezeigt.

5.6.4. Phenazin-Methosulfat

MG: 306,3
Strukturformel:



Dieser Stoff wurde als Oxidationsmittel analog zum DCIP eingesetzt.

Versuchsdaten:

HMP: 10 mM Phenazin-Methosulfat
Waschpuffer
und TEX: 3 mM Phenazin-Methosulfat

	Vergleichswert:	Phenazin-Methosulfat
Lebergewicht:	4,29 g	5,82 g
Mikrosomengewicht:	288 mg	123 mg
Proteingehalt:	5,5 mg/ml	
Insulinabbau:	39,3 % TCA-lös.	11,4 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:	nicht bestimmt	

Abb. 11:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff Phenazin-Methosulfat und Kalium-Eisen(III)-Cyanid: spezifische Rezeptorbanden

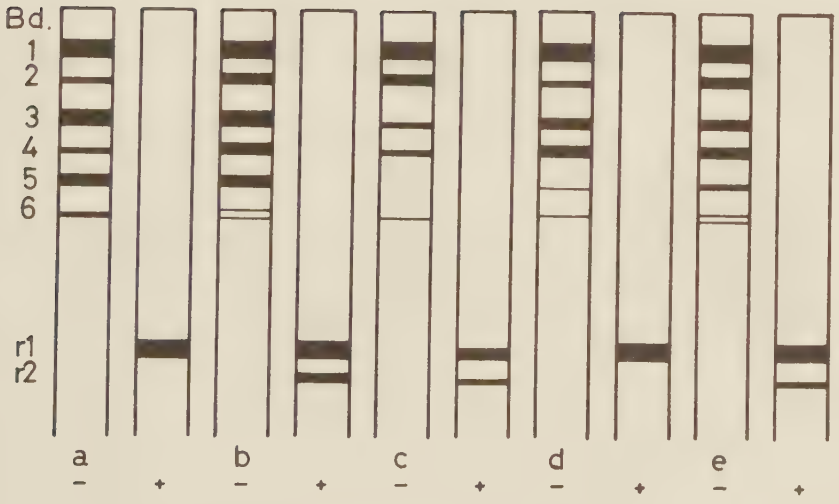
a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
± Reduktion

b ≙ Vergleichswert (TEX)
± Reduktion

c ≙ Hemmstoffversuch mit Phenazin-Methosulfat (TEX)
± Reduktion

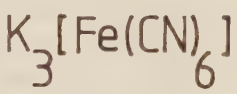
d ≙ Hemmstoffversuch mit $K_3\,Fe(CN)_6$ (Mikrosomen)
± Reduktion

e ≙ Hemmstoffversuch mit $K_3\,Fe(CN)_6$ (TEX)
± Reduktion



5.6.5. Kalium-Eisen(III)-Cyanid

MG: 329,26
Strukturformel:



Ferricyankalium sind rubinrote, monoklin-prismatische Kristalle von neutraler Reaktion. Es findet als Färbe-, Entfärbe- und Ätzmittel sowie als Reagenz auf Co, Zn, u.a. und Alkaloide Verwendung.
In Analogie zum DCIP wurde diese Substanz als weiteres Oxidationsmittel eingesetzt.

Versuchsdaten:

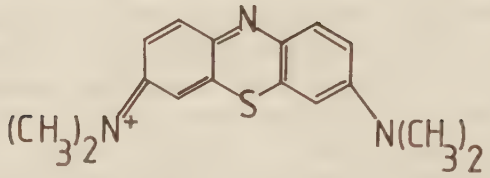
HMP: 10 mM Kalium-Eisen(III)-Cyanid
Waschpuffer
und TEX: 3 mM Kalium-Eisen(III)-Cyanid

	Vergleichswert:	$K_3\left[Fe(CN)_6\right]$
Lebergewicht:	4,29 g	6,26 g
Mikrosomengewicht:	288 mg	1165 mg
Proteingehalt:	5,5 mg/ml	8,8 mg/ml
Insulinabbau:	39,3 % TCA-lös.	9,1 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:	nicht bestimmt	

Da es für die Versuche aus Kapitel 5.6.4. und 5.6.5. nur einen gemeinsamen Vergleichswert gibt, werden sie zusammengefaßt dargestellt. Die Autoradiographie des Insulinrezeptors aus Lebermikrosomen ohne Hemmstoffzusatz weist 6 Banden unter nicht reduzierenden Bedingungen sowie r1 unter reduzierenden Bedingungen auf. Die Anzahl der gefundenen spezifischen Banden beim Vergleichswert (TEX) ist um r2 erweitert, die 6. Bande in 6a und 6b aufgesplittet und die Banden 2 und 5 in ihrer relativen Intensität verstärkt. Der Hemmstoffversuch mit Phenazin-Methosulfat (TEX) läßt lediglich die Rezeptorbanden 1 - 4 und 6b sowie r1 und r2 erkennen. Beim Hemmstoffversuch mit Kalium-Eisen(III)-Cyanid findet man bei den Lebermikrosomen wieder 6 Rezeptorbanden im nicht reduzierten Zustand. r2 unter reduzierenden Bedingungen fehlt hier. Die 4., 5. und 6. Bande ist im Vergleich deutlich abgeschwächt. Beim Tritonextrakt dieses Hemmstoffversuchs erscheint die 3. Bande im Vergleich schwächer, Bande 4 und 5 etwas verstärkt. Im DTE-reduzierten Zustand sind r1 und r2 zu sehen.

5.6.6. Methylenblau

MG: 319,86
Strukturformel:



Methylenblau ist ein Phenothiazinfarbstoff, der durch Oxidation Cysteinproteasen zu inhibieren vermag. In der Medizin wird dieser Redoxfarbstoff zur Therapie der Methämoglobinämie, von Cyanidvergiftungen und als Antiseptikum eingesetzt.

Versuchsdaten:

HMP: 1 mM Methylenblau
Waschpuffer
und TEX: 0,1 mM Methylenblau

	Vergleichswert:	Methylenblau
Lebergewicht:	4,22 g	4,51 g
Mikrosomengewicht:	420 mg	396 mg
Proteingehalt:	6,72 mg/ml	6,09 mg/ml
Insulinabbau:	21,2 % TCA-lös.	16,6 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:	nicht bestimmt	

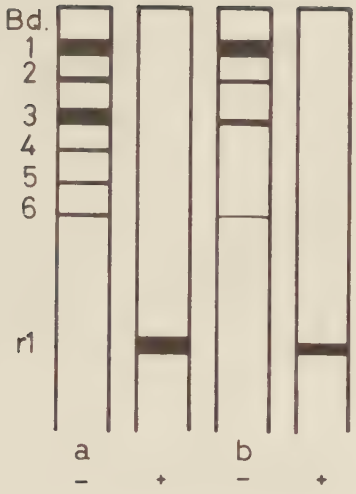


Abb. 12:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff Methylenblau: spezifische Rezeptorbanden

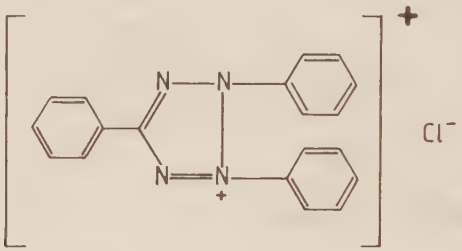
a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
± Reduktion

b ≙ Hemstoffversuch mit Methylenblau (Mikrosomen)
± Reduktion

Bei diesem Versuch zeigt der Vergleichswert unter nicht reduzierenden Bedingungen 6 spezifische Rezeptorbanden. Bande 1,2 und 3 sind deutlich zu erkennen, während die Banden 4 - 6 nur schwach ausgeprägt sind. Unter reduzierenden Bedingungen findet sich lediglich r1. Unter dem Einfluß von Methylenblau sieht man unter nicht reduzierenden Bedingungen nur 4 Banden, wobei Bande 1 als Hauptbande erscheint, 2 und 3 im Vergleich abgeschwächt sind, Bande 4 und 5 gänzlich fehlen und Bande 6 nur noch andeutungsweise zu sehen ist. Unter reduzierenden Bedingungen ist wie beim Vergleichswert nur r1 zu sehen, r2 fehlt auch hier.

5.6.7. 2,3,5 - Triphenyl-tetrazoliumchlorid (TTC)

MG: 334,8
Strukturformel:



Die farblosen, nadelförmigen Kristalle werden als Schnelltest zur Sensibilitätsprüfung von Bakterien gegenüber Antibiotika, zur Prüfung der Keimfähigkeit von Samen (keimfähige Samen hydrieren das farblose Salz zum tiefroten Triphenylformazan) und als Redoxindikator (oxidierte Stufe farblos, reduzierte Stufe farbig) verwendet.
TTC wurde analog zum DCIP als Oxidationsmittel eingesetzt.

Versuchsdaten:

HMP: 10 mM TTC
Waschpuffer
und TEX: 3 mM TTC

	Vergleichswert:	TTC
Lebergewicht:	4,29 g	5,21 g
Mikrosomengewicht:	288 mg	243 mg
Proteingehalt:	5,5 mg/ml	4,5 mg/ml
Insulinabbau:	39,3 % TCA-lös.	37,2 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:	nicht bestimmt	

Die Autoradiographien dieses Versuchs waren nicht auswertbar.

Bewertung:

GSH ist als Reduktionsmittel in der Lage, alle spezifischen Insulinrezeptorbanden zu beeinflussen. Das zeigt sich beim membrangebundenen Rezeptor durch die Zunahme der Intensität der niedermolekularen Banden und beim solubilisierten Rezeptor durch das ausschließliche Entstehen der Banden r1 und r2.

In umgekehrter Weise nehmen die eingesetzten Oxidationsmittel unterschiedlicher Potenz entweder durch direkten Angriff oder über modifizierende Enzyme Einfluß auf den Insulinrezeptor. Die Entstehung der niedermolekularen Banden wird verhindert.

5.7. Hemmstoffe der Atmungskette

Getestet wurden: Natriumfluorid, Kaliumcyanid und 2,4-Dinitrophenol

Die Hemmstoffe dieser Gruppe wurden aufgrund von Literaturhinweisen über erfolgreiche Insulinabbauhemmung bei Einsatz dieser Substanzen getestet. Die Inhibierung energieliefernder Systeme und somit auch die Inhibierung davon abhängiger Enzyme wurde allerdings nur bei Versuchen mit Zellen oder Membranen nachgewiesen. Obwohl eine vergleichbare Wirkung am isolierten Rezeptor nicht zu erwarten war, wurden NaF, KCN und DNP in Form eines Pilotversuches dennoch eingesetzt.

5.7.1. Natriumfluorid (NaF)

MG: 41,99
Strukturformel:

NaF

Natriumfluorid ist ein Hemmstoff der Phosphoglucomutase, die die Reaktion

$$\text{Glucose-1-P} \underset{\text{Glucose-1,6-P}}{\rightleftharpoons} \text{Glucose-6-P}$$

katalysiert und das Enzym Enolase, das die Reaktion

$$\text{2-P-Glycerat} \underset{-H_2O}{\rightleftharpoons} \text{2-Phosphoenolpyruvat}$$

katalysiert. Dadurch wird die anaerobe ATP-Gewinnung aus der Glycolyse verhindert und steht energieverbrauchenden enzymatischen Prozessen nicht mehr zur Verfügung. Einen Hinweis auf die Enzymhemmung von NaF, KCN und DNP bringen Draznin et al. (23) durch den Nachweis erfolgreicher Insulinabbauhemmung in Hepatocyten.

5.7.2. Kaliumcyanid (KCN)

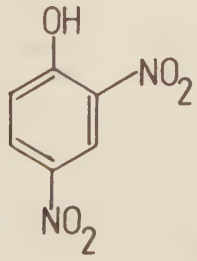
MG: 65,12
Strukturformel:

KCN

Kaliumcyanid ist ein Hemmstoff der Cytochrom-Oxydase, auch Warburgsches Atmungsferment oder Cytochrom a/a_3- Komplex genannt. Die Cytochrom-Oxydase ist das letzte Glied der Atmungskette und reagiert direkt mit dem molekularen Sauerstoff. Die Wirkung beruht darauf, daß die Cyanid-Ionen mit den Eisen-3-Ionen des Warburgschen Atmungsferments einen Cyanid-Komplex bilden. In ihm ist das Eisenion komplex von 6 Liganden umgeben und maskiert. Die Funktion ist gestört und wichtige energieabhängige Stoffwechselprozesse somit unterbrochen.

5.7.3. 2,4-Dinitrophenol (DNP)

MG: 184,11
Strukturformel:



DNP ist ebenfalls ein Hemmstoff der Atmungskette. Er wird zu den Entkopplern der Kette gezählt, weil er das Sauerstoff

verbrauchende System intakt läßt, die Atmungskettenphosphorylierung jedoch hemmt. Unter seiner Wirkung sinkt der P/Q-Quotient unter den Wert 3, da die Menge des gebildeten ATP nicht mehr dem Sauerstoffverbrauch entspricht, obwohl der Sauerstoffverbrauch erhöht sein kann.

Versuchsdaten:

HMP:	20 mM NaF und KCN 3 mM DNP
Waschpuffer und TEX:	10 mM NaF und KCN 1 mM DNP

	Vergleichswert:	NaF/KCN/DNP
Lebergewicht:	3,56 g	2,69 g
Mikrosomengewicht:	176 mg	158 mg
Proteingehalt:	2,72 mg/ml	3,5 mg/ml
Insulinabbau:	29 % TCA-lös.	33,8 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:	nicht bestimmt	

Abb. 13:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff NaF/KCN/DNP: spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
$\bar{+}$ Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch mit NaF/KCN/DNP (Mikrosomen)
$\bar{+}$ Reduktion

Die Elektrophorese des Insulinrezeptors der Lebermikrosomen ohne Hemmstoff zeigt das jetzt schon häufig gefundene Bandenmuster. Bande 1,2 und 3 sind als Hauptbanden gut ausgeprägt und gleichmäßig schwächer erscheinen die Banden 4,5 und 6 im nicht reduzierten Zustand. Im DTE-reduzierten Zustand ist r1 zu finden. Das Bandenmuster der Lebermikrosomen des Hemmstoffversuchs ist vollkommen identisch mit dem des Vergleichswertes. Übereinstimmend sind auch die Autoradiogramme der jeweiligen Versuche mit TEX. Sie werden daher nicht gezeigt.

Bewertung:

Für die Stoffe dieser Gruppe konnte kein Einfluß auf das Bandenmuster des Insulinrezeptors nachgewiesen werden.

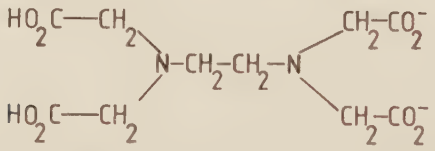
5.8. Chelatbildner

Getestet wurden: Ethylendiaminotetraessigsäure Dinatrium-Salz und 1,10-Phenanthroliniumchlorid (Monohydrat)

Aus der Gruppe der Chelatbildner wurden EDTA und o-Phenanthrolin exemplarisch zur Testung ausgewählt. Inhibiert werden sollten mit ihnen mögliche Rezeptorabbauenzyme mit zweiwertigen Ionen im aktiven Zentrum oder solche, die zweiwertige Ionen zu deren Aktivierung benötigen.

5.8.1. Ethylendiaminotetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)

MG: 372,3 (Di-Na-Salz·H_2O)
Strukturformel:



Die Säure verfügt mit den vier Carboxyl-Gruppen und den beiden N-Atomen über sechs Zentren, die als Elektronendonoren wirken und Metallionen komplexieren können. Struktur und Geometrie von EDTA ermöglicht die Ausbildung oktaedrisch gebauter Komplexe, wobei fünfgliedrige Chelatringe entstehen. Zu den Metallionen haltigen Enzymen, die durch EDTA inhibiert werden können, zählen:

Serinproteasen: Rattenleber-Chromatin Proteinase
Cysteinproteasen: Calcium abhängige Protease I und II, Cytosol-Insulin-Glucagen Proteinase
Metalloproteasen: Collagenase, Gelatinase, Elastase (5).

Im Bezug auf den Insulinabbau wäre noch zu erwähnen, daß

EDTA die Aktivität der Glutathion-Insulin-Transhydrogenase (GIT) anregt und so die Akkumulation der A-Kette des Insulins beschleunigt (73).

Versuchsdaten:

HMP: 20 mM EDTA
Waschpuffer
und TEX: 5 mM EDTA

	Vergleichswert:	EDTA
Lebergewicht:	5,10 g	5,06 g
Mikrosomengewicht:	521 mg	440 mg
Proteingehalt:	8,22 mg/ml	7,74 mg/ml
Insulinabbau:	17 % TCA-lös.	21,9 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 8,0	19,9 %	12,2 %
0.01 M/ pH 7,0	9,7 %	5,0 %

Abb. 14:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff EDTA: spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
– + Reduktion

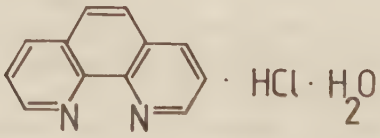
b ≙ Hemmstoffversuch mit EDTA (Mikrosomen)
– + Reduktion

c ≙ Hemmstoffversuch mit EDTA (TEX)
– + Reduktion

Beim Vergleichswert des Versuchs mit Lebermikrosomen findet man in der Autoradiographie des Insulinrezeptors sechs spezifische Banden im nicht reduzierten Zustand. Am stärksten ausgeprägt sind dabei die Banden 1 und 3, etwas schwächer Bande 2 gefolgt von den Banden 4 - 6. Reduziert ist r1 deutlich zu erkennen. Der entsprechende Hemmstoffversuch zeigt dieselbe Bandensequenz mit jedoch veränderter Intensitätsverteilung. Die Banden 1 und 3 treten gleich stark als Hauptbanden auf. Die Banden 4 - 6 sind intensitätsverstärkt. Während die Vergleichswerte solubilisierter Rezeptor und Mikrosomenrezeptor identisch sind, weist der EDTA-Versuch (TEX) im nicht reduzierten Zustand überraschend die Banden 1 - 8 auf. Die Intensität der Banden ist deutlich zu den niedermolekularen hin verschoben. Als Hauptbanden treten Bande 3 und 4 hervor. Die 8. Bande (MG 127 000) ist gut zu erkennen. Im DTE reduzierten Zustand findet man zusätzlich zu r1 die sonst unter diesen Bedingungen nicht auftretende Bande 7. r2 fehlt bei allen Versuchen.

5.8.2. 1,10-Phenanthroliniumchlorid (Monohydrat) (o-Phenanthrolin)

MG: 234,69
Strukturformel:



O-Phenanthrolin wirkt wie EDTA als Chelatbildner für zweiwertige Metallionen und hemmt demnach Proteasen, die solche Ionen zur Aktivierung benötigen. Diese Substanz wird auch zur Hemmung des Insulinabbaus eingesetzt. Bei einer Konzentration von 1 mM wird der Abbau zu ungefähr 80 % inhibiert (73).

Versuchsdaten:

HMP: 10 mM o-Phenanthrolin
Waschpuffer
und TEX: 2 mM o-Phenanthrolin

	Vergleichswert:	o-Phenanthrolin
Lebergewicht:	4,22 g	3,48 g
Mikrosomengewicht:	420 mg	253 mg
Proteingehalt:	6,72 mg/ml	6,15 mg/ml
Insulinabbau:	21,2 % TCA-lös.	11,8 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 8,0	16,2 %	11,8 %
0.01 M/ pH 7,0	7,6 %	1,0 %

Abb. 15:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff o-Phenanthrolin:
spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
– + Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch mit o-Phenanthrolin (Mikrosomen)
– + Reduktion

Die Bandenmuster des Insulinrezeptors sind für Lebermikrosomen und Tritonextrakt nahezu identisch. Beim Vergleichswert sieht man Bande 1 - 6 und die reduzierte Bande r1. Bande 1 ist am stärksten markiert; es folgen in abnehmender Intensität 3,2 und 4 sowie 5 und 6. Dem Einfluß des Chelatbildners o-Phenanthrolin ausgesetzt, läßt der Rezeptor unter nicht

reduzierenden Bedingungen nur noch 4 spezifische Banden erkennen. Mit Einschränkung wäre noch die Bande 6 zu erwähnen, deren spezifischer Charakter jedoch nicht eindeutig abgrenzbar ist. Bande 1,2 und 4 sind in ihrer relativen Intensität mit denen des Vergleichswerts übereinstimmend. Die Bande 3 ist etwas schwächer. Wie beim Vergleichswert zeigt sich unter reduzierenden Bedingungen als einzige Bande r1.

Bewertung:

Der Chelatbildner EDTA beeinflußt das Bandenmuster des Insulinrezeptors in der Weise, daß zusätzlich die spezifischen Rezeptorbanden 7 und 8 entstehen und die Intensität zu Gunsten der niedermolekularen Banden verschoben ist. Das heißt, EDTA nimmt auf reduzierende Äquivalente Einfluß. Der Chelatbildner o-Phenanthrolin beeinflußt die niedermolekularen Banden, sie erscheinen abgeschwächt. Die Bande 5 fehlt gänzlich.

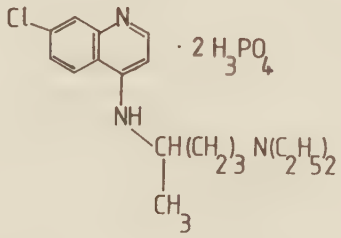
5.9. Lysosomotrope Wirkstoffe, Hemmstoffe der Rezeptorinternalisierung und Proteinbiosynthese

Getestet wurden: Chloroquin, Lidocain und Ammoniumchlorid als Hemmstoffgemisch ebenso wie Colchicin, Dansylcadaverin und Cycloheximid

Vom Insulinrezeptor wird angenommen, daß er nach Aufnahme in die Lysosomen dort entweder gespeichet, zur Membranaußenseite zurückgeführt oder abgebaut wird. Oben genannte Wirkstoffe, mit ihrer modifizierenden Wirkung auf lysosomale Enzyme, auf Internalisierung und Proteinbiosynthese wurden eingesetzt, um eventuelle noch im Homogenat wirksame Prozesse dieser Art auszuschließen. Da die Wahrscheinlichkeit einer Wirkung im desintegrierten System als gering angenommen wurde, wurden die Substanzen in Form zweier Hemmstoffgemische getestet.

5.9.1. Chloroquin

MG: 519,9
Strukturformel:

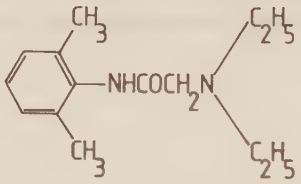


Das tertiäre Amin, 7-Chloro-4-(4-diethylamino-1-methylbutylamino)-quinolin diphosphat, in der Medizin als Antimalariatherapeutikum bekannt, wird in protonierter Form in den Lysosomen der Zelle angereichert. Durch Erhöhung des vorherr-

schenden pH hemmt es die Aktivität vieler Enzyme, die dort bei niedrigerem pH agieren. Außerdem verändert es den Ionisierungsgrad, was ein Anreichern von Flüssigkeit und Anschwellen der Lysosomen zur Folge hat. Als weiterer von Chloroquin induzierter Effekt sei in diesem Zusammenhang die Anreicherung von Insulin und Insulinrezeptor in den Lysosomen der Golgiregion von "pancreatic acini", bewirkt durch die Hemmung des Recycling, genannt (43).

5.9.2. Lidocain

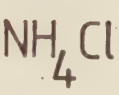
MG: 234,3
Strukturformel:



2-Diethylamino-N-[2,6-dimethylphenyl]-acetamid ist ein Lokalanästhetikum mit einem lipophilen aromatischen Rest, einer Zwischenkette und einer hydrophilen Aminogruppe. Der molekulare Mechanismus sieht wahrscheinlich folgendermaßen aus: Lidocain taucht mit seinem lipophilen Molekülanteil in die Lipidphase der Membran ein. Der positiv geladene Molekülanteil verbleibt in der wässrigen Phase. Dadurch wird die Zahl der positiven Festladungen an der Membran erhöht, was zur Folge hat, daß der Durchtritt von Na^+ und K^+ aus elektrostatischen Gründen erschwert oder unmöglich gemacht wird. Lidocain ist ein potenter Abbauinhibitor verschiedener Proteine, auch des Insulins (41). Diese Wirkung soll durch Inaktivierung von Kathepsinen und Veränderung des lysosomalen pH-Wertes oder durch Störung der Membranfunktion hervorgerufen werden.

5.9.3. Ammoniumchlorid

MG: 53,49
Strukturformel:



Ammoniumchlorid zählt wie Chloroquin und Leupeptin (vgl. Kap. 5.11.3.) zu den lysosomotropen Substanzen. Wie bei Seglen (86) beschrieben, hemmt NH_3 reversibel den lysosomalen Proteinabbau in isolierten Leberzellen der Ratte, in Konzentrationen von 10 mM ungefähr zu 70 %. Im Gegensatz zu Chloroquin und Leupeptin nimmt es auch Einfluß auf die Proteinbiosynthese. NH_3 wird schnell in den Lysosomen angereichert und stört deren Funktion durch Hemmung hydrolysierender Enzyme und Veränderung der intrazellulären Umgebung (21).

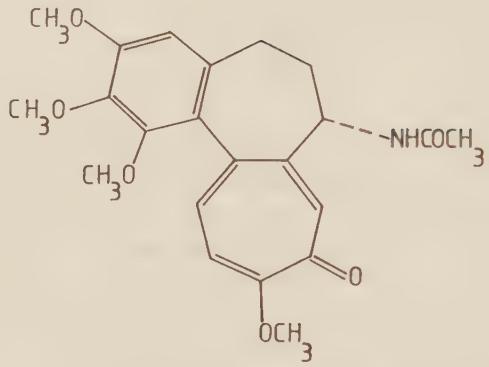
Versuchsdaten:

HMP:	10 mM Chloroquin
	5 mM Lidocain
	20 mM NH_4Cl
Waschpuffer und TEX:	3 mM Chloroquin
	3 mM Lidocain
	10 mM NH_4Cl

	Vergleichswert:	Hemmstoffgruppe
Lebergewicht:	3,56 g	2,26 g
Mikrosomengewicht:	176 mg	30 mg
Proteingehalt:	2,7 mg/ml	1,0 mg/ml
Insulinabbau:	29 % TCA-lös.	15,3 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:	nicht bestimmt	

5.9.4. Colchicin

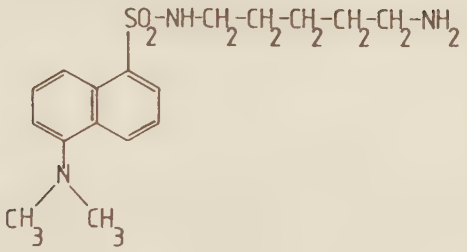
MG: 399,4
Strukturformel:



Colchicin hemmt, durch spezifische Bindung an Tubulin, Mikrotubuli. Laut Posner et al. (78) werden durch Colchicin die Galaktosyl- und Sialinsäure-Transferaseaktivität der Rattenleber-Golgimembranen, die Aufnahme und die Proteinsynthese in der Leber gehemmt, ebenso wie die Sekretion in einer Vielzahl von Geweben, z.B. in der Leber, wo die Ausschüttung von VLDL, Albumin und anderer Plasmaproteine unterbunden wird. Weiter wird von Entkopplung rezeptorvermittelter Endozytose und Exocytose sowie von Endocytosehemmung berichtet. Nachweislich wird auch der Abbau von EGF (epidermal growth factor), von Glycoproteinen mit Sulfatresten und Insulin inhibiert.

5.9.5. Dansylcadaverin

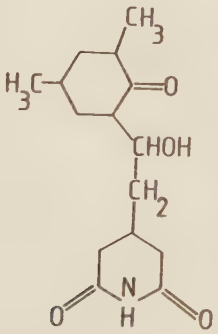
MG: 333,5
Strukturformel:



N-(5-Aminopentyl)-5-dimethylamino-1-naphthalinsufonamid ist wie von Plas und Desbuquois (76) beschrieben ein effektiver Insulinabbauinhibitor. Gehemmt wird auch das Enzym Gluathion-Insulin-Transhydrogenase und möglicherweise auch eine insulinspezifische Proteinase. Die rezeptorvermittelte Endozytose des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) wird durch obige Substanz blockiert und daraus gefolgert, daß ähnliches für den Insulin-Rezeptor-Komplex gilt.

5.9.6. Cycloheximid

MG: 281,3
Strukturformel:



3-[2(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl]glutarimid, ein Hemmer der Proteinbiosynthese, inhibiert die Translokase der 80 S Ribosomen eukaryoter Zellen, nicht aber die der 70 S-Ribosomen der Prokaryonten. Cycloheximid, auch Actidion genannt, blockiert das Zustandekommen der Peptidbindung. Die semiautonome Proteinsynthese der Mitochondrien dieser Zellen wird nicht beeinflußt.

Versuchsdaten:

	Vergleichswert:	Hemmstoffgruppe
Lebergewicht:	3,56 g	1,91 g
Mikrosomengewicht:	176 mg	80 mg
Proteingehalt:	2,7 mg/ml	1,2 mg/ml
Insulinabbau:	29 % TCA-lös.	25 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:	nicht bestimmt	

Abb. 16:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff Chloroquin/Lidocain/NH_4Cl und Hemmstoff Colchicin/Dansylcadaverin/Cycloheximid: spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
– + Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch mit
1.) Chloroquin
Lidocain
NH_4Cl
2.) Colchicin
Dansylcadaverin
Cycloheximid
– + Reduktion

Bei diesen Autoradiographien des Insulinrezeptors in Lebermikrosomen ist eine nahezu vollständige Übereinstimmung der Bandenmuster von Vergleichswert und Hemmstoffversuch zu beobachten. Unter nicht reduzierenden Bedingungen erscheint lediglich die 6. Bande des Hemmstoffversuchs etwas abgeschwächt. Unter reduzierenden Bedingungen taucht jeweils r1 auf.

Bewertung:

Da das Rezeptorbandenmuster des Hemmstoffversuchs bis auf eine unwesentliche Intensitätsabschwächung mit dem des Vergleichswertes übereinstimmt, darf angenommen werden, daß die Wirkstoffe dieser Gruppe im desintegrierten System keinen Einfluß auf das Bandenmuster des Insulinrezeptors haben.

5.10. Hemmstoffe mit Einfluß auf den Kohlenhydratanteil des Insulinrezeptors

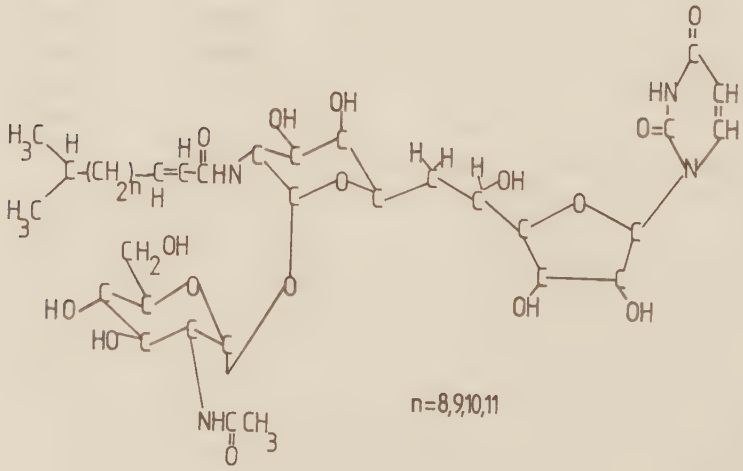
Getestet wurden: Tunicamycin und 2-Desoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure

Diese Substanzen wurden in einem Versuch zusammen mit pCMB eingesetzt.

Da der Insulinrezeptor ein Glycoprotein ist, wurden zwei Vertreter der auf Kohlenhydratstoffwechselprozesse Einfluß nehmenden Substanzen ausgewählt, um durch deren Einsatz einen möglichen Rezeptorabbau und damit die Entstehung von Rezeptorbanden durch glycolysierende Enzyme bzw. durch Neuraminidaseaktivität auszuschließen.

5.10.1. Tunicamycin

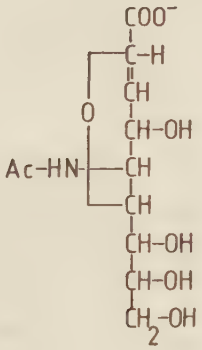
MG:
Strukturformel:



Tunicamycin ist ein Nucleosid-Antibiotikumkomplex, der von Streptomyces lysosuperficus produziert wird (89). Indem es den N-Acetylglucosamin-1-Phosphat-Transfer von UDP-N-Acetylglucosamin zu Dolichol-Monophosphat unterbindet, hemmt es die Glycolysierung von Proteinen. Die Auswirkungen auf den Stoffwechsel des Insulinrezeptors siehe (51,68,80,83,90).

5.10.2. 2-Desoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure (DDANS)

MG: 291,3
Strukturformel:



Wie von Mohr 1960 berichtet (72), beobachtete Walop schon zwei Jahre zuvor, daß die Neuraminidase durch N-Acetyl-Neuraminsäure, also durch das Spaltprodukt des Substrats gehemmt wird. Neuraminidase trennt Sialinsäurereste von Glycoproteinen ab. Kompetitive Hemmung des Enzyms durch DDANS wird für Sialinsäure viralen, bakteriellen und menschlichen Ursprungs beschrieben (94). Der Abbau des Insulinrezeptors durch Neuraminidaseaktivität sollte durch Einsatz von DDANS ausgeschlossen werden.

Versuchsdaten:

HMP:	1 µg/ml Tunicamycin (Löslichkeit: 1 mg in 2,5 ml 50 5igem MeOH)
	0,15 mM DDANS
	1 mM pCMB
Waschpuffer und TEX:	1 µg/ml Tunicamycin
	0,15 mM DDANS
	0,03 mM pCMB

	Vergleichswert:	Hemmstoffgruppe
Lebergewicht:	2,89 g	3,80 g
Mikrosomengewicht:	176 mg	285 mg
Proteingehalt:	2,7 mg/ml	3,5 mg/ml
Insulinabbau:	46,1 % TCA-lös.	7,3 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:	nicht bestimmt	

Abb. 17:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff Tunicamycin/DDANS/pCMB:
spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
∓ Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch mit Tunicamycin/DDANS/pCMB (Mikrosomen)
∓ Reduktion

Der Vergleichswert ebenso wie der Rezeptor im Hemmstoffversuch weisen im nicht reduzierten Zustand die Rezeptorbanden 1 - 6 auf, im reduzierten Zustand r1. Als einziger Unterschied fällt im Hemmstoffversuch eine abgeschwächte Bande 3 auf. Dieser Effekt ist mit Sicherheit auf pCMB-Wirkung zurückzuführen da er bereits in der Autoradiographie des Kap. 5.5.2. zu beobachten ist.

Bewertung:

Da die einzige Abweichung vom Bandenmuster des Vergleichswertes auf die Einwirkung von pCMB zurückzuführen ist, haben die Hemmstoffe dieser Gruppe offensichtlich keinen Einfluß auf das Bandenmuster des Insulinrezeptors in Lebermikrosomen.

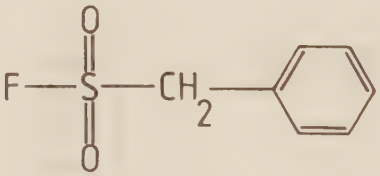
5.11. Sonstige Proteasenhemmer

Getestet wurden: Phenylmethylsulfonylfluorid, 1,2-Epoxy-3-(nitrophenoxy)-propan, Aprotinin sowie Leupeptin, Pepstatin und Antipain als Hemmstoffgruppe

Nachdem in der Literatur auch darüber diskutiert wird, daß proteolytische Prozesse für die Entstehung von Rezeptorbanden verantwortlich sein könnten, wurde eine Auswahl von Proteasenhemmstoffen getestet, die ein möglichst breites Spektrum dieser Enzymgruppe abdecken.

5.11.1. Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

MG: 174,2
Strukturformel:



PMSF ist als Proteasenhemmstoff hinreichend beschrieben (5). Im Falle der Serinproteasen reagiert PMSF mit dem Serinrest im aktiven Zentrum. Chong et al. (11) berichteten über die Hemmung einer neutralen Chromatin Protease.
Serinproteasen, die durch diese Substanz inhibiert werden können, sind:
Trypsin, Chymotrypsin, Coagulation Factor $\overline{\text{XII}}$a, $\overline{\text{XI}}$a, $\underline{\text{X}}$a, $\overline{\text{VII}}$a, Thrombin, Protein C, Plasmin, Complement Component $\overline{\text{C1r}}$, Leukocyten-Elastase, Neutrophil Proteinase 3, Chymase I und II, Human-Bone-Marrow-Serin-Protease, Thymus-Chromatin-Proteinase.
Als Esterasenhemmer eingesetzt, wird z.B. Acetylcholinesterase inhibiert.

Versuchsdaten:

HMP: gesättigte Lösung PMSF (ca. 3 mM)

Waschpuffer
und TEX: 1 mM PMSF

	Vergleichswert:	PMSF
Lebergewicht:	2,77 g	3,35 g
Mikrosomengewicht:	264 mg	307 mg
Proteingehalt:	3,6 mg	3,5 mg
Insulinabbau:	23,6 % TCA-lös.	10,7 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 8,0	11,3 %	8,9 %
0.01 M/ pH 7,0	5,2 %	5,9 %

Abb. 18

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff PMSF: spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
– / + Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch mit PMSF
– / + Reduktion

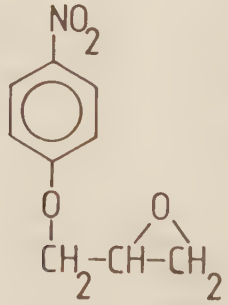
Beim Vergleichswert findet man Bande 1 - 6 und r1 des Insulinrezeptors der Lebermikrosomen markiert. Die Intensität ist vergleichbar mit der in Kap. 5.10.2. beschriebenen. Wurde PMSF in angegebener Konzentration zugegeben, so fehlte bei

den Rezeptorbanden der Lebermikrosomen die Bande 5 völlig. Bande 6 erscheint fraglich spezifisch nur andeutungsweise. Die Banden des Hemmstoffversuchs sind insgesamt schwächer markiert, wobei Bande 2 des Hemmstoffversuchs eine Ausnahme bildet, sie nimmt an Intensität zu.

Bewertung:
PMSF-Einsatz in genannter Konzentration bewirkt eine Änderung des spezifischen Bandenmusters ähnlich der für NEM (vgl. Kap. 5.5.1.) beschriebenen. Es ist in der Lage niedermolekulare Bandenentstehung zu verhindern und bewirkt eine Konzentrationsverschiebung zu den höhermolekularen Banden hin.

5.11.2. 1,2-Epoxy-3-(p-nitrophenoxy)-propan (EPNP)

MG: 195,2
Strukturformel:



EPNP ist ein Asparaginsäure-Proteasenhemmstoff, der eine strukturelle Analogie zur Aminosäure Phenylalanin zeigt. Von ihm wird irreversibel Pepsin inhibiert, indem u.a. die Carboxylgruppe durch kovalente Bindung im aktiven Zentrum verestert wird. Die Hemmung weiterer Verdauungsenzyme wird beschrieben (91).

Versuchsdaten:

HMP: 10 mM EPNP
Waschpuffer
und TEX: 3 mM EPNP

	Vergleichswert:	EPNP
Lebergewicht:	4,1 g	4,1 g
Mikrosomengewicht:	403 mg	420 mg
Proteingehalt:	5,5 mg/ml	6,5 mg/ml
Insulinabbau:	22,6 % TCA-lös.	18 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 8,0	17,3 %	15,9 %
0.01 m/ pH 7,0	6,7 %	5,8 %

Abb. 19:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff EPNP: spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
− / + Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch mit EPNP (Mikrosomen)
− / + Reduktion

Völlige Übereinstimmung im gefundenen Bandenmuster, wobei lediglich r2 im Hemmstoffversuch zusätzlich auftaucht.

Bewertung:

EPNP hat keinen Einfluß auf das Bandenmuster des Insulinrezeptors, also beeinflußt ihn weder direkt noch über Beeinflussung modifizierender Enzyme.

5.11.3. Aprotinin

Aprotinin, ein Hemmstoff der Plasminbildung und des Plasmins, ist ein Polypeptid, MG 6 000, aus 58 Aminosäuren bestehend. Es wird aus Rinderorganen (Parotis, Pankreas) gewonnen und inhibiert viele proteolytischen Enzyme. Genannt sei die Hemmung des Kallikreins im System der Kinine, des Trypsins und Chymotrypsins.

Versuchsdaten:

HMP: 3 000 KIE/ml
Waschpuffer und TEX: 2 000 KIE/ml

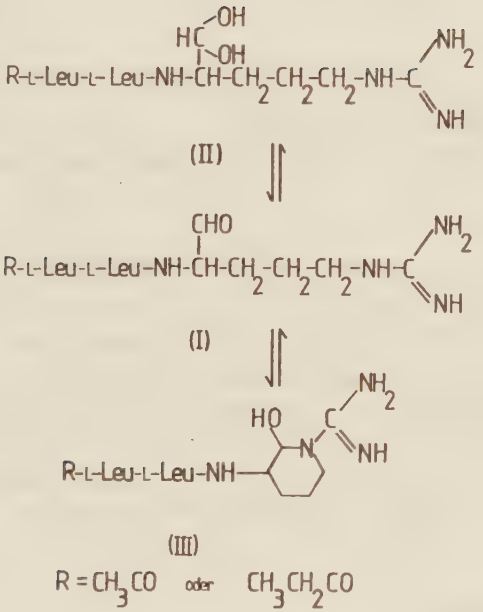
	Vergleichswert:	Aprotinin
Lebergewicht:	2,7 g	3,6 g
Mikrosomengewicht:	252 mg	530 mg
Proteingehalt:	8,7 mg/ml	13,3 mg/ml
Insulinabbau:	nicht bestimmt	
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 0,8	20,9 %	20,8 %
0.01 M/ pH 0,7	8,3 %	8,6 %

Die Autoradiographien dieses Versuchs sind übereinstimmend mit den in Kap. 5.11.2. gezeigten. Sie weisen keinerlei Abweichungen vom Vergleichswert auf.

Bewertung:
Aprotinin hat keinen Einfluß auf die Entstehung von Insulinrezeptorbanden.

5.11.4. Leupeptin

MG: 475,6
Strukturformel:



(III)

R = CH_3CO oder CH_3CH_2CO

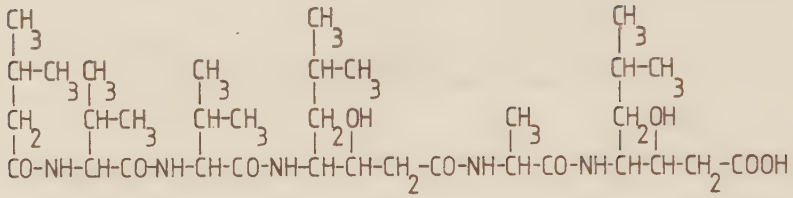
Leupeptin ist ein Proteasenhemmstoff mikrobiologischen Ursprungs, er wurde u.a. in Streptomyces roseus, - roseochromogenes, - chartreusis, - albireticuli, - thioeutens, - lavendulae und - noboritoenis gefunden. Bezüglich des lysosomalen Proteinabbaus zeigt Leupeptin vergleichbares Verhalten wie NH_3 mit dem Unterschied, daß die Abbauhemmung irreversibel ist (86). Von der Vielzahl der Enzyme, die Leupeptin hemmt, seien folgende genannt (4,92):

Serinproteasen: Trypsin, Plasmin, Complement Component $\overline{Cls}$ Gewebe-Kallikrein, Ribosomale Serin Protease, Muskel- und Uterus Trypsin-like-Protease, Papain

Cysteinproteasen: Cathepsin B, Cathepsin H, Cathepsin L,N,S, Calcium abhängige Protease II

5.11.5. Pepstatin

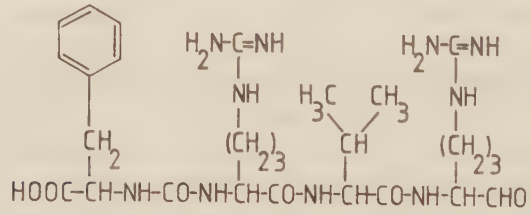
MG: 685,9
Strukturformel:



Isovaleryl-L-valyl-valyl-[(3S,4S)]-4-amino-3-hydroxy-6-methyl-heptanoyl-L-Alanyl-[(3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-6-methyl]-Heptansäure ist ein Hemmstoff saurer Proteasen mikrobiologischen Ursprungs und wird bei einer Vielzahl von Actinomycetes Spezies gefunden. Vornehmlich werden Asparaginsäure-Proteasen gehemmt wie: Pepsin A und C, Seminal- und Uropepsin, Chymosin, Plasma-Asparaginsäure-Protease, Renin,Cathepsin D, Lymphocyten-Asparagin-Protease und Cathepsin E.

5.11.6. Antipain

MG: 677,6
Strukturformel:



[(S)-1-Carboxy-2-phenylethyl]carbamoyl-L-arginyl-L-valyl-arginial wird von Streptomyces rhichigaenis, Streptomyces

yokosukaenis und anderen Spezies von Actinomyceten produziert.

Von Antipain inhibierte Serinproteasen sind:

Papain, Trypsin, Thrombokinase, Cathepsin A, Cathepsin B, Plasmin, Acrosin und Gewebe-Kallikrein (5).

Bei Mensch und Maus hemmt Antipain die Blutkoagulation (92).

Versuchsdaten:

HMP: 2 µg/ml Leupeptin
3 µg/ml Pepstatin
3 µg/ml Antipain

Waschpuffer und TEX: dieselben Konzentrationen

	Vergleichswert:	Hemmstoffgruppe
Lebergewicht:	6,24 g	6,88 g
Mikrosomengewicht:	945 mg	930 mg
Proteingehalt:	8,6 mg/ml	7,1 mg/ml
Insulinabbau:		
spezifische Insulinbindung:	wurden nicht bestimmt	

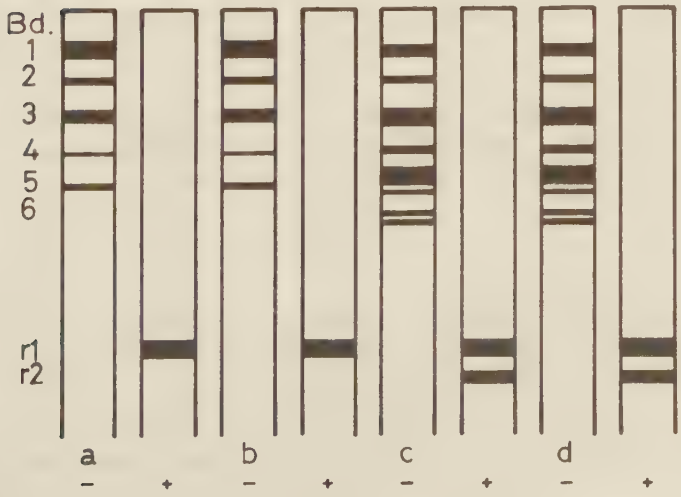


Abb. 19:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoff Leupeptin/Pepstatin/Antipain:
spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
− + Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch (Mikrosomen)
− + Reduktion

c ≙ Vergleichswert (TEX)
− + Reduktion

d ≙ Hemmstoffversuch (TEX)
+ + Reduktion

In diesem Versuch findet man bei den Lebermikrosomen des Vergleichswerts die Rezeptorbanden 1 - 5, sowie r1. Übereinstimmung zeigt das Bandenmuster des Hemmstoffversuchs mit dem Vergleichswert. Der solubilisierte Rezeptor hingegen zeigt sich in der Form, daß sowohl beim Vergleichswert als auch im Hemmstoffversuch 6 Banden im nicht reduzierten Zustand auftauchen. Die Banden 5 und 6 sind in a und b aufgespalten. Die relative Intensität ist ebenfalls übereinstimmend verteilt. Bei den Tritonextrakten deutlich erkennbar die als Prinzip bereits öfters gefundene Verschiebung der Intensität zu den niedermolekularen Banden hin.

Bewertung:

Leupeptin, Pepstatin und Antipain haben in den angegebenen Konzentrationen keinen Einfluß auf den Insulinrezeptor, weder direkt noch auf ihn modifizierende Enzyme.

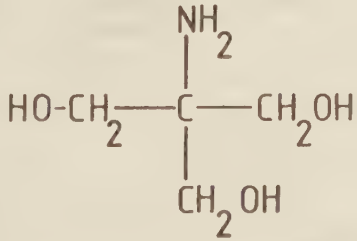
5.12. Sonstige Hemmstoffe

Getestet wurden: Tris(hydroxy-methyl)amino-methan,
Albumin und Bacitracin

Die drei Hemmstoffe dieser Gruppe wurden aus jeweils verschiedenen Gründen noch mitgetestet. Im Falle von Tris, dem oxidative Eigenschaften zugeschrieben werden, waren auch widersprüchliche Hinweise aus der Literatur ausschlaggebend, wonach Tris das Bindungsverhalten des Insulinrezeptors erheblich beeinflußt (52). Albumin wurde als unspezifischer Inhibitor gewählt, da dieses Protein ganz allgemein Enzym-Substrat-Kontakte verhindern kann. Bacitracin, das sich als guter Insulinabbauhemmer, vornehmlich bei Versuchen mit Zellen aber auch beim isolierten Rezeptor bewährt hat, wurde in Analogie dazu getestet. Bei allen Substanzen sollte eine mögliche Auswirkung auf den Rezeptorabbau und somit auf die Entstehung von Rezeptorbanden untersucht werden.

5.12.1. Tris(hydroxy-methyl)amino-methan (Tris)

MG: 121,14
Strukturformel:



Tris wird allgemein als biologischer Puffer verwendet, weil er keine oder nur geringfügige Chelatbildung mit Ca^{2+}, Mg^{2+} und Mn^{2+} zeigt. Stabile Komplexe werden mit Ag^{+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} und Pb^{2+} gebildet. Im Falle von Tris-Cu^{2+} und $Tris_2$-Cu^{2+}-Komplexbildung kommt es zur Oxidation der SH-Gruppe der Aminosäure Cystein oder anderer SH-Proteine (88).

Versuchsdaten:

HMP: 0.01 M Tris + 0.25 M Sucrose
Waschpuffer und TEX: 0.01 M Tris

	Vergleichswert:	Tris
Lebergewicht:	2,77 g	2,83 g
Mikrosomengewicht:	264 mg	420 mg
Proteingehalt:	3,6 mg/ml	2,8 mg/ml
Insulinabbau:	23,6 % TCA-lös.	27,6 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/pH 8,0	11,3 %	25,0 %
0.01 M/pH 7,0	5,2 %	11,1 %

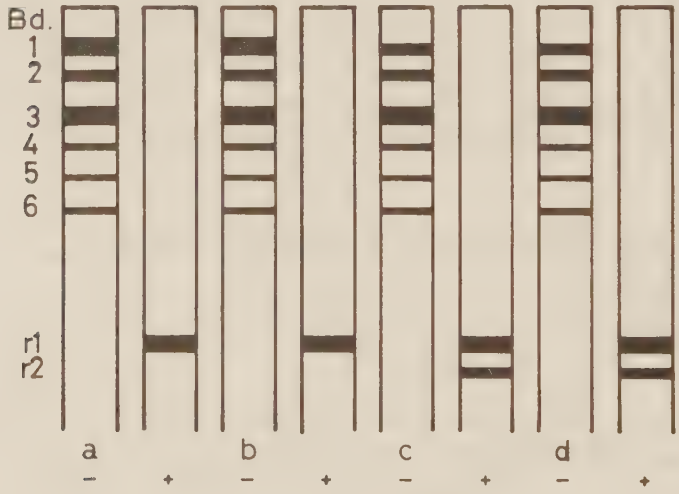


Abb. 20:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoffversuch mit Tris: spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
− + Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch (Mikrosomen)
− + Reduktion

c ≙ Vergleichswert (TEX)
− + Reduktion

d ≙ Hemmstoffversuch (TEX)
− + Reduktion

Der unter Zusatz von Tris aufgearbeitete und elektrophoretisierte membrangebundene Rezeptor zeigt im erhaltenen spezifischen Bandenmuster keine Abweichungen vom Vergleichswert. Es werden 6 Banden gefunden, wobei Bande 1 und 3 am stärksten markiert werden. Auch beim solubilisierten Rezeptor ist kein Unterschied zwischen Vergleichswert und Hemmstoffversuch festzustellen. Hier tritt die Bande 3 am stärksten auf. Im reduzierten Zustand zeigt sich neben r1 in beiden Autoradiographien noch r2. Diese Bande fehlt bei den Versuchen mit Lebermikrosomen.

5.12.2. Albumin aus Rinderserum (BSA)

Albumin ist ein Serumprotein, dessen vornehmliche Funktion Transport, Osmoregulation und Thyroxinbindung sind. Bei Insulinabbaustudien zeigte sich, daß durch Zugabe von Albumin konzentrations- und zeitabhängig die proteolytische Aktivität erheblich beeinflußt werden kann. Beim Einsatz von 50 mg/ml und einer Inkubationsdauer von 130 Min. bei 37° C konnte kein Abbau mehr gemessen werden (36).

Versuchsdaten:

HMP: 2 % BSA
Waschpuffer
und TEX: 0,5 % BSA

	Vergleichswert:	BSA
Lebergewicht:	5,25 g	6,43 g
Mikrosomengewicht:	887 mg	1134 mg
Proteingehalt:	7,2 mg/ml	4,5 mg/ml
Insulinabbau:	29,4 % TCA-lös.	18,7 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/ pH 0,8	16,2 %	27,0 %
0.01 M/ pH 0,7	7,6 %	11,0 %

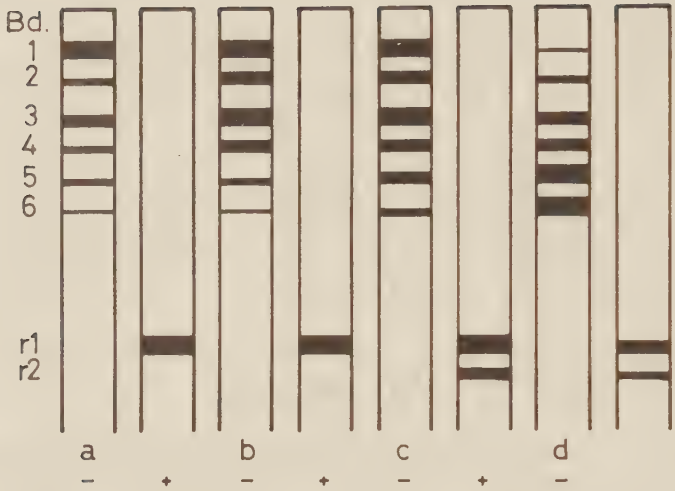


Abb. 21:

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoffversuch mit BSA: spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
$\bar{+}$ Reduktion

b ≙ Hemmstoffversuch (Mikrosomen)
$\bar{+}$ Reduktion

c ≙ Vergleichswert (TEX)
$\bar{+}$ Reduktion

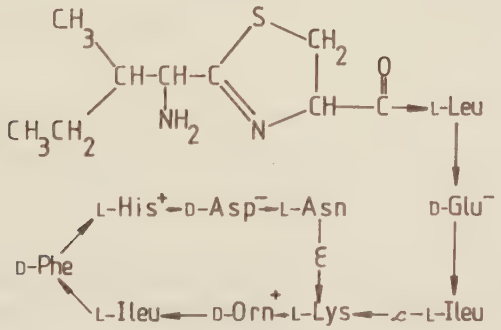
d ≙ Hemmstoffversuch (TEX)
$\bar{+}$ Reduktion

Der Insulinrezeptor der Lebermikrosomen markiert beim Vergleichswert 6 Banden unter nicht reduzierenden Bedingungen und die Bande r1 unter reduzierenden Bedingungen. Das spezifische Bandenmuster im Hemmstoffversuch zeigt im Vergleich numerische keine Abweichungen. Die relative Intensität betreffend fallen jedoch Bande 2, 3 und 4 deutlicher aus. Der autoradiographierte solubilisierte Rezeptor des Vergleichswerts läßt nicht reduziert 6 Banden und reduziert r1 und r2 erkennen. Die Banden sind im Gegensatz zum mem-

brangebundenen Rezeptor in ihrer relativen Intensität stärker und im Hemmstoffversuch deutlich zu den höher numerierten Banden hin verschoben, sodaß es fast gerechtfertigt erscheint, von einer Intensitätsumkehr zu sprechen. Die Beurteilung der 6. Bande gestaltet sich etwas schwierig, da sie von Albuminpolymeren überlagert wird.

5.12.3. Bacitracin

MG: 1450
Strukturformel:



Bacitracin wurde 1945 durch B.A. Johnson et al. als ein wasserlösliches, relativ instabiles Polypeptid-Gemisch aus dem Kulturfiltrat von Bacillus licheniformis isoliert. Die Hauptkomponente, Bacitracin A, wurde als Cycloheptapeptid mit einer aus 5 Aminosäuren bestehenden Seitenkette identifiziert. Für die biologische Wirksamkeit des Bacitracin A ist wesentlich, daß das terminale L-Isoleucin und das L-Cystein nicht durch eine normale Amid-Bindung, sondern durch einen hydrolyse- und oxidationsempfindlichen Δ^2-Thiazolin-Ring verbunden ist.
Bekannt ist auch die Hemmung hydrolysierender Enzyme durch Bacitracin A wie z.B. die nicht kompetitive Hemmung der Papain katalysierten Hydrolyse von N-Benzoyl-DL-arginyl-2-

naphthylamid und Subtilisin, Papain und Leucin-Aminopeptidase katalysierte Hydrolyse von Ac-Leucyl-2-naphthylamid. Schwach gehemmt wird auch α-Chymotrypsin (67).

Versuchsdaten:

HMP: 5 mM Bacitracin
Waschpuffer
und TEX: 2 mM Bacitracin

	Vergleichswert:	Bacitracin
Lebergewicht:	3,85 g	4,05 g
Mikrosomengewicht:	383 mg	454 mg
Proteingehalt:	5,7 mg/ml	6,3 mg/ml
Insulinabbau:	36,9 % TCA-lös.	2,6 % TCA-lös.
spezifische Insulinbindung:		
0.1 M/pH 0,8	25,6 %	26,1 %
0.01 M/pH 0,7	10,8 %	18,6 %

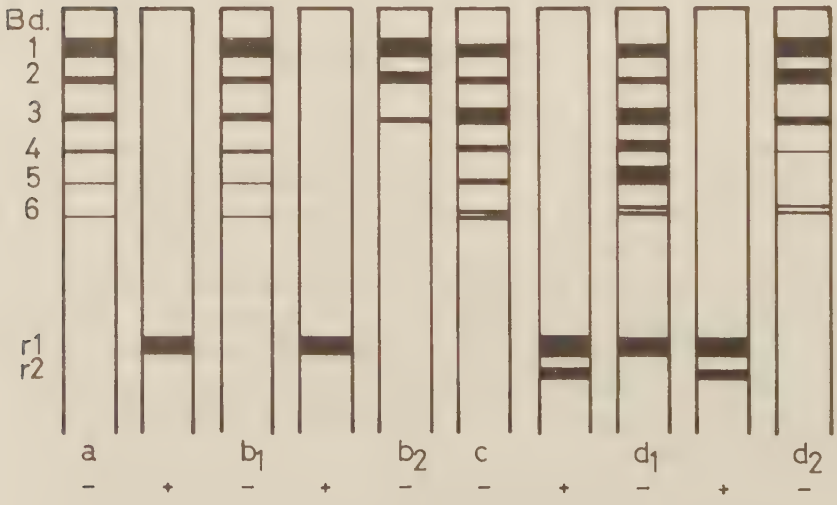


Abb. 22

Autoradiogramme von SDS-PAGEn, Hemmstoffversuch mit Bacitracin: spezifische Rezeptorbanden

a ≙ Vergleichswert (Mikrosomen)
$\bar{+}$ Reduktion

b_1 ≙ Hemmstoffversuch (Mikrosomen)
$\bar{+}$ Reduktion

b_2 ≙ Hemmstoffversuch (Mikrosomen)
+ NEM

c ≙ Vergleichswert (TEX)
$\bar{+}$ Reduktion

d_1 ≙ Hemmstoffversuch (TEX)
$\bar{+}$ Reduktion

d_2 ≙ Hemmstoffversuch (TEX)
+ NEM

Die Bandenmuster des Insulinrezeptors aus Lebermikrosomen zeigen für den Vergleichswert und den Hemmstoffversuch kein differierendes Bild. Gefunden werden die Banden 1 - 6 und die reduzierte Bande r1. Die Bande 1 ist am stärksten markiert. Der Insulinrezeptor im Tritonextrakt markiert ebenfalls 6 Banden unter nicht reduzierenden Bedingungen, wobei die Bande 6 in 6a und 6b aufgeteilt ist. Abweichend von den Lebermikrosomen sind hier beide reduzierten Banden r1 und r2 zu finden. Der in Triton gelöste Rezeptor des Vergleichswerts jedoch zeigt ein Intensitätsmaximum bei der Bande 3, Bande 4 und 5 sind jetzt deutlich ausgeprägt, während Bande 1 abgeschwächt erscheint. Im Hemmstoffversuch (TEX) wird nicht nur Bande 3, sondern gleich stark Bande 5 und zunehmend Bande 4 und 6 gekennzeichnet. Unter b_2 und d_2 werden die Autoradiographien des Insulinrezeptors der Hemmstoffversuche mit NEM-Zusatz wie in Kap. 4.9. beschrieben, gezeigt. b_2 zeigt den membrangebundenen Rezeptor. Hier werden nur 3 Banden markiert, deren relative Intensität von Bande 1 nach 3 abnimmt. d_2 zeigt den solubilisierten Rezeptor mit den Banden 1 - 4 und 6a und 6b. Die relative Intensität ist deutlich in den Banden 1 und 2 konzentriert.

Bewertung:

Durch Einsatz von Tris konnte das Insulinrezeptorbandenmuster nicht beeinflußt werden. Albumin Zusatz zeigt bezüglich des spezifischen Bandenmusters reduzierende Effekte insofern, daß beim membrangebundenen Rezeptor ab Bande 2 alle niedermolekularen Banden verstärkt werden und beim solubilisierten Rezeptor eine Intensitätsumkehr festzustellen ist.
Bacitracin beeinflußt den Insulinrezeptor in ähnlicher Weise wie Albumin, jedoch werden die reduzierenden Effekte erst beim solubilisierten Rezeptor sichtbar.

6. DISKUSSION

Dieser Arbeit lag die Frage nach dem Aufbau des Insulinrezeptors zugrunde. Eine präzise Antwort auf diese Frage wird wohl erst durch eine Röntgenstrukturanalyse ermöglicht werden oder wenn, wie eingangs erwähnt, eine geeignete Kontrastierungstechnik für hochauflösende Elektronenmikroskopie zur Verfügung steht. Zu diesem Zeitpunkt klärbar erschien jedoch die Frage nach der Herkunft der Rezeptorbanden, wie sie in der SDS-Gelelektrophorese, einer heute routinemäßig angewandten Analysemethode, auftreten. Können alle gefundenen Elektrophoresebanden dem Rezeptor als in vivo vorkommende Untereinheiten zugeordnet werden oder entstehen diese oder einige von ihnen artifiziell bei der Materialaufarbeitung, die der Analyse vorausgeht? Würde sich am SDS-PAGE-Bandenmuster etwas ändern, wenn vom Zeitpunkt der Organentnahme an dem Medium zur Unterbindung verschiedenster Enzymaktivitäten, die möglicherweise für die Entstehung von Spaltprodukten verantwortlich sind, Hemmstoffe zugesetzt werden? Könnten bei einer solchen Vorgehensweise Banden hervorgerufen oder unterdrückt werden und damit Schlüsse auf deren Ursprung gezogen werden?

Für die Auswahl der Substanzen dienten folgende Kriterien:
1. generelle Enzymhemmer,
2. spezifische Gruppenreagenzien,
3. Funktionshemmer.

Wegen der funktionellen Beziehung dienten auch mit Insulinabbauhemmern gewonnene Erfahrungen orientierend. Eine Auflistung der in acht Gruppen zusammengefaßten Substanzen findet sich im Inhaltsverzeichnis. Diese Substanzen wurden dem Homogenisationsmedium, in das die Rattenleber sofort nach Entnahme gegeben wurde, zugesetzt. Zuvor wurde jeder Puffer mittels NaOH bzw. HCL wieder auf den gewünschten pH-Wert von 7.4 eingestellt, da sich zum Teil erhebliche Abweichungen durch die Inhibitoren ergaben. Die Mikrosomen, die als Membranfraktion mittels differentieller Zentrifugation isoliert wurden, stellten das Ausgangsmaterial für alle in dieser

Arbeit durchgeführten Untersuchungen dar (vgl. Kap. 4.4. - 4.5.). Die intrazellulären Membranen der Mikrosomenfraktion, die mengenmäßig gegenüber der Zellmembran dominieren, und für die hohe Bindungsaktivitäten gemessen werden, stellen eine günstige Quelle für Insulinrezeptoren dar. Nachgewiesenermaßen sind für die hohe Bindungsaktivität dieser Zellfraktion hauptsächlich intrazelluläre Rezeptoren verantwortlich, da die Kontaminationsrate durch Plasmamembranstücke mit 10 % sehr niedrig ist (19).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Bindungstests (vgl. Kap. 4.7.1. und 4.7.2.), die der Präparation folgten, dienten nicht der Charakterisierung des Rezeptors, sondern waren Maßstab für die letztlich gewählten Hemmstoffkonzentrationen. Es mußten Kompromisse gefunden werden zwischen einer möglichst hohen Konzentration an Inhibitor und der Gewährleistung einer spezifischen Bindung des ^{125}J-Insulins an den Rezeptor, da u.a. von Koch (56) für Substanzen wie NEM, pCMB, Methylenblau, $K_3[Fe(CN)_6]$, Phenazin-Methosulfat, EDTA, $CuSO_4$, GSH und andere konzentrationsabhängig eine starke Beeinträchtigung der Insulin-Rezeptor-Bindung beschrieben wurde. Ohne spezifische Bindung jedoch hätte sich eine weitere Analyse erübrigt, da keine Photoaffinitätsmarkierung der Rezeptoren möglich gewesen wäre. Die Bindungsstudien wurden unter zwei Pufferbedingungen durchgeführt, da Trennversuche mittels Gelfiltration für den Insulinrezeptor aus Tritonextrakten zwei insulinbindende Peaks, d.h. zwei Rezeptorspezies mit einem Stokes' Radius von 92 Å (Peak I) und 80 Å (Peak II) ergaben. Diese Spezies unterscheiden sich im Bindungsverhalten gegenüber ^{125}J-Insulin bezüglich Ionenstärke- und pH-Optimum. So bindet Peak I am besten bei pH 8,0 und hoher Ionenstärke (≙Bedingung I, mit 0.1 M KNaPP pH 8,0) während Peak II sein Bindungsoptimum bei pH 7,0 und niedriger Ionenstärke hat (≙Bedingung II, mit 0.01 M KNaPP pH 7,0). Es wird angenommen, daß der Peak II-Rezeptor ein Teil des Peak I-Rezeptors ist. Ausführlicheres dazu siehe bei Koch (56). Ergebnisse zur spezifischen Bindung können zusammengefaßt dem Kap. 5.2. entnommen werden.

Einzelergebnisse finden sich auch bei den jeweiligen Hemmstoffversuchen (Kap. 5.5. - 5.12.). Scatchard-Analysen entfielen aus obengenanntem Grund.

Gleich dem Bindungstest soll auch die Bestimmung des Insulinabbaus, obwohl sie routinemäßig durchgeführt wurde, nicht ausführlich diskutiert werden, da sie lediglich als Beurteilungskriterium für die Insulinbindung bzw. als Funktionsnachweis für die in der Literatur als Insulinabbauinhibitoren bezeichneten Substanzen diente. Sie diente im Analogschluß auch dazu, Rezeptorabbauinhibitoren zu finden. Insulinabbau wurde für Membranpräparationen und -extrakte aus verschiedenen Geweben (49,73) und auch für verschiedene Zellen wie Hepatozyten (9), Fettzellen (69), Fibroblasten (2) und Lymphozyten (87) nachgewiesen. Nach der Internalisierung soll das gebundene Insulin in den Lysosomen der Zelle rezeptorvermittelt (62), aber auch unabhängig von diesem abgebaut werden (22). Auch nichtlysosomale Abbauenzyme wie Glutathion-Insulin-Transhydrogenase (93) und eine Insulin-Protease (24) wurden identifiziert. In dieser Arbeit wurde der Insulinabbau mit Hilfe der TCA-Fällung (vgl. Kap. 4.8.) bestimmt. Obwohl diese Methode kritikwürdig ist, da nicht der gesamte Insulinabbau erfaßt werden kann,weil intaktes Insulin durch große A14-^{125}J-Insulin-Bruchstücke, die mit 5 % TCA noch gefällt werden, vorgetäuscht wird, decken sich die Ergebnisse gut mit denen anderer Autoren, die z.T. andere Methoden wie z.B. Radioimmunassay und das "rebinding" von Insulin an seinen Rezeptor anwendeten.
Das hervorstechendste Ergebnis der Insulin-Abbau-Untersuchungen besteht im Nachweis bzw. in der Erweiterung der schon bekannten Tatsache, daß nämlich SH-Enzyme beim Insulinabbau eine wesentliche Rolle spielen. Mikrosomen eignen sich für diese Untersuchungen besonders gut, da sie als Sitz dieser Enzyme angesehen werden (81). So konnte mit 3 mM NEM, 0,03 mM pCMB, 3 mM Jodacetamid oder 0,01 mM $CuSO_4$ im Ansatz der Insulinabbau durch Mikrosomen nahezu vollständig unterdrückt werden. Aus der Tatsache, daß NEM den Abbau bereits im Homogenat völlig hemmt, ließe sich schliessen, daß der In-

sulinabbau nur durch SH-Enzyme bewirkt wird. Zu berücksichtigen ist dabei jedoch, wie schon erwähnt, daß die TCA-Fällung relativ unempfindlich ist und Insulin wahrscheinlich durch Proteasen in große Bruckstücke gespalten wird, die beim Test mitgefällt werden. Kein signifikanter Unterschied, verglichen mit dem Abbauverhalten des Kontrollwerts, konnte für Cytochalasin B festgestellt werden. Da Cytochalasin B jedoch nachweislich SH-Gruppen reversibel blockiert, darf angenommen werden, daß die Konzentration (1 µg/ml) für sichtbare Effekte zu gering war. Gute mit der Literatur übereinstimmende Ergebnisse konnten auch mit den Redoxreagenzien DCIP (3 mM), GSSG (3 mM), Phenazin-Methosulfat (3 mM), Methylenblau (0,1 mM), Kalium-Eisen-III-Cyanid (3 mM) erzielt werden. In der Regel dürfte der Wirkmechanismus auf der Oxidation von SH-Gruppen beruhen. Ebenfalls gut Ergebnisse wurden für den Chelatbildner für zweiwertige Metallionen o-Phenanthrolin (2 mM), den Serinproteasenhemmstoff PMSF (3 mM) und für Bacitracin (2 mM) gefunden. Dieser Substanz wird die Hemmung der Glutathion-Insulin-Transhydrogenase zugeschrieben (84) und somit Inhibierung des Insulinabbaus (39).

Nachdem in Vorversuchen die Hemmstoffkonzentrationen, die noch hinreichende spezifische Bindung des ^{125}J-Insulins an den Rezeptor erlaubten, festgelegt waren, wurde zusätzlich aus den Mikrosomensuspensionen mittels Triton-X-100 der Rezeptor solubilisiert (Durchführung siehe Kap. 5.4.). Der membrangebundene und der gelöste Rezeptor wurde dann photoaffinitätsmarkiert und der SDS-PAGE unterworfen. Neben der nach Klotz (53) durchgeführten kovalenten Verknüpfung von ^{125}J-MABI unter Einwirkung von UV-Licht mit dem Rezeptor (vgl. Kap. 4.9.) gibt es noch weitere, in der Einleitung bereits erwähnte Markierungsmöglichkeiten. Hieraus resultiert eine der Schwierigkeiten, die auftauchen, will man eigene für den Insulinrezeptor und Untereinheiten gefundene Molekulargewichte und Bandenmuster mit den in der Literatur beschriebenen vergleichen, da verschiedene Markierungsmethoden sowie verschiedene Elektrophorese-Systeme zu abweichen-

den Ergebnissen führen (58). Dies trifft sowohl für die Anzahl der Rezeptorbanden, als auch für deren molekulare Größe zu. Mit der Markierungsmethode, die sich radioaktiver Insulinderivate bedient, werden nur die an der Bindung des Insulins beteiligten Untereinheiten erfaßt. Bei den sogenannten "crosslinkern" besteht zusätzlich die Möglichkeit, daß benachbarte Moleküle, die nicht zum Insulinrezeptor gehören, kovalent an diesen gebunden werden. Eine übersichtliche Orientierungshilfe bzgl. dieses Problems ist in Tab. 6 unter "Molekulargewichtsdaten des Insulinrezeptors und seiner Untereinheiten in der Literatur" bei Koch (56) zu finden.

Eine kritische Anmerkung zu der gemäß Kap. 4.10. durchgeführten gewählten Analysemethode, der SDS-PAGE nach Laemmli, soll nicht versäumt werden. Trotz Reproduzierbarkeit sind die gefundenen Molekulargewichte mit Vorsicht zu betrachten; denn es ist bekannt, daß hydrophobe Membranproteine, Glykoproteine und Proteine mit inter- und intrachenaren Disulfidbindungen und somit auch der Insulinrezeptor auf SDS-PAGEn atypisches Laufverhalten zeigen (29,77) und mit den globulären ideal laufenden Standardproteinen nur eingeschränkt zu vergleichen sind. Um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, wurden in dieser Arbeit Gradientengele verwendet. Die ermittelten Molekulargewichte sind in Tabelle 1 im Kap. 5.4. aufgelistet. Die Streuung der einzelnen MG-Werte beruht auf Abweichungen im Aufbau des Gradienten durch Vermischung beim Giessen, auf Temperaturdifferenzen während des Laufs sowie auf Abweichungen in der Laufzeit und anderen systematischen Fehlern, die bei der Vielzahl der durchgeführten Elektrophoresen, die zur Bestimmung herangezogen wurden, nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnten. Zudem gestaltet sich die exakte Bestimmung höhermolekularer Banden mangels geeigneter hochmolekularer Standardproteine schwierig. Ohne DTE-Reduktion vor der Elektrophorese wurden für den Rezeptor in der Regel 6 spezifische Banden und gelegentlich eine 7. und 8. Bande gefunden. Bande 1 (MG 428 000), Bande 2 (MG 384 000), Bande 3 (MG 342 000), Bande 4 (MG 309 000),

Bande 5 (MG 256 000), Bande 6 (MG 218 000), Bande 7 (MG 170 000) und Bande 8 (MG 125 000). Der DTE-Reduktion (20 mM) unterworfen, ließ sich der Rezeptor durch Bande r1 (MG 133 000) und Bande r2 (MG 115 000) charakterisieren.

Eine gut Übereinstimmung der Bandenmuster zeigte sich innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe. So liegen die von Klotz (54) ermittelten Banden des Insulinrezeptors aus Hepatozyten in einem Laemmli-Gradientengel (4-10 %) mit Bande 1 (MG 390 000), Bande 2 (MG 360 000), Bande 3 (MG 320 000), Bande 4 (MG 290 000) und Bande 5 (MG 245 000) im selben Rahmen. Die in der vorliegenden Arbeit schon unter nicht reduzierenden Bedingungen gefundene Bande 6 zeigte sich dort allerdings erst nach partieller Reduktion. Die beiden vollreduzierten Banden r1 (MG 133 000) und r2 (MG 115 000) sind in beiden Arbeiten gleich. Die Banden 1 - 5 sind auch identisch mit den von Koch et al. (59) gefundenen. Auch die von Deger (18) im 4-10 %igen Laemmli-Gel ermittelten Größen, für Peak I (Bande 1 - 5) und für Peak II (Bande 6 - 7), sowie die beiden DTE-reduzierten Banden r1 und r2,stimmen mit den eigenen Größen überein.

Die im nicht reduzierenden System gefundenen Insulinrezeptorbanden mit denen der Literatur zu vergleichen, ist, wie schon erwähnt, problematisch. Allgemein werden unter nicht reduzierenden Bedingungen Rezeptorbanden gefunden, die den Banden 1 - 3 entsprechen (70, 70a, 40a). Daß die Molekulargewichte der Rezeptorbanden 1 - 3 (nicht reduziert) und 6 - 7 (schwach reduziert), die von Czech und Massague (16,70) sowie von Jacobs et al. (44) gefunden werden, kleiner sind als die eigenen Werte, liegt vermutlich daran, daß ein anderes Markierungsverfahren und kontinuierliche Laemmli-Gele verwendet wurden.

Die Intensität der Banden ist beim mikrosomalen Rezeptor in der Regel so verteilt, daß unter nicht reduzierenden Bedingungen Bande 1 und 3 am stärksten markiert werden. Die Banden 4,5 und 6 kommen üblicherweise gleich stark, jedoch

deutlich schwächer als Bande 1 und 3 zur Darstellung. Die Bande 2 nimmt im Verteilungsmuster eine Mittelstellung ein. Unter reduzierenden Bedingungen erscheint r1 immer wesentlich intensiver als r2. Beim solubilisierten Rezeptor konnte entweder ein Intensitätsverteilungsmuster wie das für den membrangebundenen Rezeptor beschriebene beobachtet werden oder es ergab sich eine Verschiebung der Intensität im nicht reduzierenden System von den höher- zu den niedermolekularen Banden. Worauf diese Änderung der relativen Intensitäten der Banden nach Extraktion zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Allgemein können Intensitätsabweichungen durch Unterschiede in der Proteinkonzentration und der Anzahl der Reduktionsäquivalente in den zu vergleichenden Proben ebenso wie durch unterschiedliche SDS-Behandlung dieser Proben zustandekommen. Möglicherweise handelt es sich bei den Intensitätsveränderungen, wie sie teilweise beim solubilisierten Rezeptor festgestellt wurden, um einen Effekt, der durch die Tritonbehandlung des Rezeptors bei Raumtemperatur hervorgerufen wird. Die beschriebene Veränderung verstärkt sich unter dem Einfluß von reduzierenden Agenzien. Im Falle von EDTA (vgl. Kap. 5.8.1.), besonders aber von BSA (vgl. Kap. 5.12.1.) und Bacitracin (vgl. Kap. 5.12.2.) kann fast von einer Intensitätsumkehr gesprochen werden. Im GSH-Versuch wird der Rezeptor sogar bis zur Bande r1 reduziert (vgl. Kap. 5.6.1.). Ähnliche Beobachtungen wurden auch in (18) und (54) beschrieben.

Welche Beobachtungen konnten jetzt im einzelnen bei den Hemmstoffversuchen gemacht werden?
Im einzelnen sei auf den Ergebnisteil verwiesen, denn hier sollen der Übersicht halber nur besonders auffällige Veränderungen innerhalb der Gruppen aufgegriffen werden. Zudem erscheint es nicht sinnvoll, geringfügige Abweichungen zu interpretieren, da sie ursächlich auch anderen, teils schon erwähnten Faktoren zugeschrieben werden können. Alle Abweichungen werden in Relation zum jeweiligen Kontrollwert diskutiert.

In der 1. Gruppe, in der SH-Gruppen blockierende Substanzen wie NEM, pCMB, Jodacetamid, Kupfersulfat und Cytochalasin B getestet wurden, ist NEM zweifelsohne der wichtigeste Vertreter. Im Autoradiogramm des Hemmstoffversuchs sind unter nicht reduzierenden Bedingungen lediglich die spezifischen Insulinrezeptorbanden 1,2,3 und schwach 6 sichtbar. Die relative Intensität ist dabei folgendermaßen verteilt: $1 \geq 2 > 3$. Das heißt im Bezug auf den Kontrollwert, daß die Bande 3 und 6 abgeschwächt wird und die Banden 4 und 5 überhaupt nicht mehr auftauchen. Die 2. Bande erscheint verstärkt. Diese Beobachtung steht exemplarisch für alle Hemmstoffe dieser Gruppe. Die in der SDS-PAGE nach Laemmli erhaltenen spezifischen Insulinrezeptorbanden 3 (teilweise), 4,5 und 6 sind Reduktionsprodukte, da ihr Entstehen von SH-Gruppen blockierenden Substanzen inhibiert werden kann. Dieser Effekt kann dadurch hervorgerufen werden, daß entweder SH-Gruppen von Enzymen oder beliebige SH-Gruppen gehemmt werden. Ein Angreifen der Disulfidbrücken des Rezeptors wird somit verhindert. Mit Ausnahme von Cytochalasin B ist dieser Effekt bei den übrigen Substanzen der Gruppe ebenfalls, wenn auch weniger deutlich,zu sehen. Bei pCMB ist, bedingt durch die schlechte Löslichkeit der Substanz, sicherlich die zu geringe Konzentration im Ansatz ausschlaggebend. Während beim Kupfersulfat die negative Beeinflussung der spezifischen Insulinbindung die Konzentration limitierte, war es beim Cytochalasin B der hohe Preis dieser Substanz. Dieser Hemmstoffversuch zeigte daher als einziger der Gruppe keine sichtbaren Effekte.

Wie im Kap. 5.3. beschrieben, wurde die Photoaffinitätsmarkierung aller Versuche dieser Arbeit in An- und Abwesenheit von NEM durchgeführt, wobei folgendes zu beobachten war. Wurde NEM (3 mM) zur Abbauhemmung dem Inkubationsansatz der Photoaffinitätsmarkierung zugefügt, zeigte der unter nicht reduzierenden Bedingungen autoradiographierte Insulinrezeptor nur die Banden 1,2,3 und schwach oder überhaupt nicht die Bande 6. Die parallelen Läufe ohne NEM wiesen dagegen eine höhere Bandenzahl auf. Ein Beispiel wird

in Abb. 22 im Kap. 5.12.3. gezeigt. Vergleicht man das Bandenmuster b_2 dieser Abbildung mit dem Bandenmuster b in Abb. 4 des Kap. 5.5., so ist deutlich zu sehen, daß NEM die gleichen Auswirkungen zeigt, ob es nun bereits im Homogenat vorhanden ist oder erst dem Inkubationsansatz der Photoaffinitätsmarkierung zugefügt wird. Es werden daher im Ergebnisteil nur Autoradiographien gezeigt, bei denen ohne NEM photoaffinitätsmarkiert wurde.
Bis auf den Kupfersulfatversuch fand man bei allen Hemmstoffen dieser Gruppe unter reduzierenden Bedingungen neben der regelmäßig auftretenden Bande r1 noch eine zweite, schwächere Bande r2. Über die Entstehung dieser Bande läßt sich im Moment noch nichts Sicheres sagen.

Die Ergebnisse der zweiten Gruppe, die der getesteten Redoxreagenzien, bestätigen die bisher gemachten Beobachtungen und die daraus gezogenen Schlüsse. Das als Reduktionsmittel eingesetzte GSH (3 mM) beeinflußt alle spezifischen Rezeptorbanden. Im Versuch mit Lebermikrosomen werden zwar die Banden 1 bis 6 und r1 markiert, vergleicht man jedoch das nicht DTE-reduzierte Bandenmuster mit dem des Kontrollwertes, sieht man eine deutliche Verlagerung der Intensität in den niedermolekularen Bereich. Verstärkt sichtbar werden die Banden 3,4,5 und 6. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß ab Bande 3 Reduktion für die Entstehung weiterer Untereinheiten verantwortlich sein dürfte. Die Intensitätsverschiebung der Banden 1 - 3 von 1 nach 3 könnte dabei eventuell auch durch GSH-abhängige Proteolyse verursacht sein. Noch deutlicher zeigt der GSH-Versuch mit solubilisiertem Insulinrezeptor dessen Redoxempfindlichkeit. Ohne DTE-Zusatz werden in der SDS-PAGE mit 3 mM GSH lediglich die Banden r1 und r2 markiert. Diese Banden werden sonst nur mit 20 mM DTE im Ansatz gefunden. Daraus läßt sich in Erweiterung obiger Aussage ableiten, daß GSH nach Herauslösen des Insulinrezeptors aus der Membranintegrität durch direkten Angriff an allen Disulfidbrücken in der Lage ist, den Gesamtkomplex bis auf die den Banden r1 und r2 entsprechenden Einheiten zu reduzieren.

Bei den Versuchen mit den Oxidationsmitteln DCIP (5 mM), Phenazin-Methosulfat (10 mM), Kalium-Eisen(III)-Cyanid (10 mM), Methylenblau (1 mM) und TTC (10 mM), läßt sich der Vorgang in umgekehrter Weise beobachten. Alle Reagenzien beeinflussen das SDS-PAGE-Bandenmuster des Insulinrezeptors so, daß die niedermolekularen partiell reduzierten Banden entweder überhaupt nicht oder nur schwach ausgeprägt entstehen und bei den höhermolekularen Banden die Intensität in Richtung zur 1. Bande hin verschoben ist. Der deutlichste Nachweis findet sich dabei im Versuch mit DCIP. Durch Hemmung der Reduktionsäquivalente findet man in der SDS-PAGE nur Bande 1,2 und 3 als Hauptbanden. Gleiches gilt für den Versuch mit Methylenblau. Bande 1 erscheint verstärkt, Bande 2 und 3 bereits abgeschwächt gegenüber dem Kontrollwert und Bande 4 und 5 fehlen ganz. Andeutungsweise sind noch spezifische Anteile der 6. Bande zu erkennen. Gleichlautend sind auch die Ergebnisse mit Phenazin-Methosulfat und Kalium-Eisen(III)-Cyanid. Daß hier die Hemmung nicht vollständiger ausfällt, könnte an den gewählten Konzentrationen und den unterschiedlichen Redoxpotentialen der Inhibitoren liegen. Für TTC fehlt eine entsprechende Dokumentation.

Den Hemmstoffen der Atmungskette, NaF, KCN und DNP, kann keine besondere Bedeutung bezüglich ihrer Auswirkung auf das Rezeptorbandenmuster zugeschrieben werden, da keine Abweichungen vom Kontrollwert festgestellt wurden. Die Entstehung der Insulinrezeptor-Untereinheiten im desintegrierten System dürfte demnach ATP-unabhängig ablaufen.

Die eingesetzten Chelatbildner EDTA (20 mM) und ortho-Phenanthrolin (10 mM) (vgl. Kap. 5.8.) brachten unterschiedliche Ergebnisse. Während beim EDTA-Versuch mit Tritonextrakt zusätzlich die spezifischen Rezeptorbanden 7 und 8 (MG 170 000 und MG 127 000) auftraten und die Intensität der niedermolekularen Banden im Vergleich zum Kontrollwert zunahm, sind im ortho-Phenanthrolin-Versuch die niedermolekularen Banden 4 und 6, aber auch schon die Bande 3 abgeschwächt. Die Bande 5 fehlt hier vollkommen. Die Bande 7

taucht im EDTA-Versuch neben r1 zudem unter reduzierenden Bedingungen auf. Die Analogie zwischen dem Bandenmuster des GSH- und des EDTA-Versuchs deutet darauf hin, daß der Chelatbildner EDTA in der Lage ist, reduzierende oder proteolytische Enzyme zu aktivieren. Angesichts der EDTA-Ergebnisse sind die Ergebnisse des Versuchs mit ortho-Phenanthrolin nicht erklärbar.

Die Stoffe mit lysosomotroper Wirkung bzw. diejenigen, denen in intakten Zellen Einflußnahme auf den Internalisierungsprozess und die Proteinbiosynthese zukommt, (vgl. Kap. 5.9.) hatten, zumindest in den gewählten Konzentrationen, im Homogenat keine Auswirkung auf das spezifische Insulinrezeptorbandenmuster.

Keinen Einfluß haben auch die in Kap. 5.10. getesteten Hemmstoffe Tunicamycin und 2-Desoxy-2,3-dehydro-N-acetylneuraminsäure. Sie wurden zusammen mit pCMB eingesetzt und zeigten als einzige Abweichung vom Kontrollwert eine Abschwächung der Bande 3. Da dieses Phänomen bereits im Kap. 5.5.2. beim Versuch mit pCMB als Monosubstanz beschrieben wurde, dürfte die festgestellte Abweichung auch hier dieser Substanz zugeschrieben werden. Das heißt, daß glycosylierende Enzyme bzw. Neuraminidaseaktivität an der Entstehung von Rezeptorbanden nicht beteiligt sind. Dieses Ergebnis deckt sich mit entsprechenden anderen Untersuchungen (52 a).

Nachdem in der Literatur auch darüber diskutiert wurde, daß proteolytische Prozesse für die Entstehung von Rezeptorbanden verantwortlich sein könnten, wurde eine Auswahl von Proteasenhemmstoffen getestet, die ein möglichst breites Spektrum dieser Enzymgruppe abdecken (vgl. Kap. 5.11.). Für alle außer PMSF ausgetesteten Substanzen gilt, daß sie die gefundenen Bandenmuster nicht verändern. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die Hemmstoffkonzentrationen zu niedrig waren, daß nicht die richtige Auswahl getroffen wurde oder daß die Rezeptoruntereinheiten nicht durch Proteolyse entstehen. Im Falle von Leupeptin, Pepstatin und Antipain, deren Wirkop-

timum im sauren Bereich liegt, könnte der neutrale Bereich, in dem alle Versuche durchgeführt wurden, eine Beeinflussung verhindert haben.
Eine Beeinflussung des Insulinrezeptorbandenmusters in der SDS-PAGE ähnlich der im Hemmstoffversuch mit NEM bereits dokumentierten (vgl. Kap. 5.5.1.), wurde für den Serin-Proteasen- und Esterasen-Hemmstoff PMSF gefunden. Bei einer Konzentration von 3 mM PMSF im Ansatz sieht man in der Autoradiographie des elektrophoretisierten membrangebundenen Rezeptors im nicht reduzierten Zustand die Banden 3 und 6 abgeschwächt. Bande 5 fehlt ganz. Die Intensität der 2. Bande hingegen nimmt zu. Wie bei NEM dürfte die Veränderung des Rezeptorbandenmusters jedoch auf die Hemmung von SH-Gruppen zurückzuführen sein, die den Rezeptor entweder direkt oder mittels modifizierender Enzyme reduzieren würden. Daß die Hemmung unvollständig ausfällt, könnte ein Konzentrationsproblem sein, da PMSF schlecht wasserlöslich ist und zudem die Insulin-Rezeptor-Bindung negativ beeinflußt.

Auf Grund von Literaturhinweisen, wonach Tris das Bindungsverhalten des Insulinrezeptors beeinflussen soll und es im Falle von Tris-Cu^{2+} und $Tris_2$-Cu^{2+}-Komplexbildung zur Oxidation von SH-Gruppen der Aminosäure Cystein oder anderer SH-Gruppen kommen soll (vgl. Kap. 5.12.1.), wurde auch diese Substanz getestet. Im Vergleich mit dem Kontrollwert konnte jedoch keine Änderung im Rezeptorbandenmuster der SDS-PAGE festgestellt werden.

Eine sichtbare Beeinflussung der Insulinrezeptorbanden brachte der Versuch mit dem als unspezifischer Inhibitor eingesetzten Albumin (2 % im Ansatz), dessen Wirkung vermutlich auf einer allgemeinen Enzym-Substrat-Kontakthemmung beruht. Wie beim Kontrollwert sieht man in der Elektrophorese des membrangebundenen Rezeptors 6 spezifische Banden, deren Intensität jedoch ab Bande 2 deutlich nach unten verstärkt ist. Unter reduzierenden Bedingungen ist ohne Abweichung r1 zu finden. Die Autoradiographie des solubilisierten Rezeptors zeigt dann ein Phänomen, auf das eingangs in

der Diskussion bereits hingewiesen wurde. Bei gleicher Bandenzahl kam es zu einer Intensitätsumkehr, d.h. als Hauptbanden werden die Bande 5 und 6 markiert mit Abnahme der Intensität in Richtung zur 1. Bande hin. Zu berücksichtigen ist, daß die Bande 6 nicht eindeutig zu beurteilen ist, da Albuminpolymere das Rezeptorbandenmuster überlagern. Eine solche Veränderung des Rezeptorbandenmusters sieht man in ähnlicher Weise bei den Versuchen mit Substanzen, die reduzierend wirken. Es wird daher angenommen, daß auch die im Albumin-Versuch zu beobachtenden Effekte auf eine reduzierende Wirkung von freien SH-Gruppen des Albumins zurückzuführen ist.

Nachdem der Insulinabbau sowohl in Versuchen mit Zellen als auch mit isoliertem Rezeptor durch Bacitracin erfolgreich gehemmt werden konnte, lag es nahe, eine mögliche Auswirkung dieser Substanz auf den Rezeptorabbau und somit auf die Entstehung von Rezeptorbanden zu untersuchen. In Analogie zu den Insulinabbaustudien wurde daher Bacitracin (vgl. Kap. 5.12.3.) getestet. Unter dem Einfluß von 5 mM Bacitracin waren unter nicht reduzierenden Bedingungen 6 spezifische Rezeptorbanden zu sehen. Unter reduzierenden Bedingungen r1. Dieses Muster ist noch identisch mit dem des Kontrollwerts. Erst beim solubilisierten Rezeptor kommt es zu Abweichungen. Die Banden 4,5 und 6 (a + b) sind deutlich verstärkt, während die Bande 1 abgeschwächt ist. r1 und r2 treten unverändert gegenüber dem Kontrollwert auf. Im Gegensatz zum Albumin-Versuch ändert sich das Bandenmuster erst beim solubilisierten Rezeptor, was vermutlich auf der reduzierenden Wirkung des Δ^2-Thiazolinrings beruht. Wie schon wiederholt festgestellt wurde, reagiert der Insulinrezeptor nach Herauslösen aus der Membranintegrität offensichtlich empfindlicher auf reduzierende Substanzen. Die bei diesem Hemmstoffversuch gezeigten Autoradiographien (Abb. 22 b_2 + d_2), bei denen in An- und Abwesenheit von NEM photoaffinitätsmarkiert wurde, dokumentieren exemplarisch die SH-Gruppen Blockierung durch NEM. Es werden nur drei Banden unter nicht reduzierenden Bedingungen markiert, wobei die Bande 1

als Hauptbande erscheint. Nicht mehr so deutlich fällt die Hemmung beim solubilisierten Rezeptor aus. Weil er der Tritonbehandlung bei Raumtemperatur ausgesetzt und aus dem Membranverband herausgelöst wird, schreiten die reduktiven Einflüsse auf den Rezeptor fort, sodaß NEM die Ausbildung der partiell reduzierten Banden 4 und 6 nicht mehr verhindern kann.

Einer alle Versuche betreffenden Beobachtung soll noch nachgegangen werden. So konnte zwar unter reduzierenden Bedingungen regelmäßig die spezifische Bande r1 (MG 133 000) gefunden werden, r2 (MG 115 000) jedoch vornehmlich nur beim solubilisierten Rezeptor. Eine Erklärung dafür konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Die Herkunft und Bedeutung dieser Bande bleibt ungeklärt. Möglich wäre, daß es sich dabei um ein Abbauprodukt der Bande r1 handelt. r2 könnte dabei bereits in der Membran vorliegen, jedoch für eine Insulinbindung nicht zugänglich sein. Es könnte aber auch sein, daß es sich bei der Bande r2 um einen Insulin-bindenden Präparationsartefakt handelt.

Zum Schluß möchte ich noch ein paar Überlegungen zur Struktur des Insulinrezeptors anstellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich am ehesten mit dem in der Einleitung vorgestellten Modell von Czech et al. (16) und Jacobs et al. (44) in Einklang bringen. Diese Autoren postulieren ein Rezeptormodell dessen Grundstruktur ein symmetrisches Tetramer darstellt, welches aus α- und ß-Untereinheiten aufgebaut ist. Aufgrund ihrer Ergebnisse in der SDS-PAGE soll der Rezeptor in der Form $(\alpha ß)_2$ und über Disulfidbrücken in folgender Weise aufgebaut sein:

ß-SS-α-SS-α-SS-ß

Sie erhielten in der SDS-PAGE folgende Banden:

ohne Reduktion	$(\alpha ß)_2$	≙ MG 350 000
	$(\alpha ß)(\alpha ß_1)$	≙ MG 320 000
	$(\alpha ß_1)_2$	≙ MG 290 000

bei schwacher Reduktion	($\alpha\beta$)	≙ MG 210 000
	($\alpha\beta_1$)	≙ MG 160 000
bei starker Reduktion	α	≙ MG 125 000
	β	≙ MG 90 000
	β_1	≙ MG 49 000

In dieser Arbeit konnten unter nicht reduzierenden Bedingungen in der SDS-PAGE nach Laemmli mit Gradienten-Gelen in der Regel 6 spezifische Rezeptorbanden gefunden werden, wobei Bande 1 (MG 428 000), Bande 2 (MG 384 000) und Bande 3 (MG 342 000) den ersten drei Banden in obigem Modell entsprechenden dürften. Daß die Molekulargewichte dabei höher liegen, dürfte darauf beruhen, daß andere Markierungsmethoden und andere Gele für die SDS-PAGE verwendet wurden. Die Bande 4 (MG 309 000) und 5 (MG 256 000) sind im obigen Modell nicht zu finden. Die Bande 6 (MG 218 000) und die Bande 7 (MG 170 000) dürften den im obigen Modell bei schwacher Reduktion gefundenen entsprechen. Andere (18,54) erhielten diese Banden ebenfalls ohne Reduktion. Die vollreduzierte Bande r1 (MG 133 000) entspricht der obigen α-Bande. Die Bande r2 (MG 115 000) ist jedoch nicht identisch mit der ß-Bande im Czechschen Modell. Diese Bande, eventuell ein Abbauprodukt von α, wurde daher mit α' bezeichnet. Ein β_1-Bruchstück (MG 49 000) konnte von mir nicht markiert werden. Anzumerken wäre, daß ß und β_1 auch bei Czech nur sehr schwach markiert werden, und daß bei der von ihm angewandten Markierungsmethode (crosslinking) oftmals benachbarte Moleküle mit erfaßt werden.

Das Modell mit den von mir gefundenen Rezeptorbanden könnte dann folgendermaßen aussehen:

	ß - α - α - ß	≙	Bande 1 MG 428 000
	ß - α - α - β_x	≙	Bande 2 MG 384 000
	ß - α - α	≙	Bande 3 MG 342 000
oder	β_x - α - α - β_x		
	β_x - α - α	≙	Bande 4 MG 309 000
	α - α	≙	Bande 5 MG 256 000
	ß - α	≙	Bande 6 MG 218 000
	β_x - α	≙	Bande 7 MG 170 000

α ≙ Bande r1 (MG 133 000) und α' ≙ Bande r2 (MG 115 000).

Mit $ß_x$ ist das am Rezeptor verbleibende ß-Reststück nach Abspaltung von $ß_1$ (MG 49 000) von der ß-Untereinheit (MG 90 000) bezeichnet.
Bande 1 in der SDS-PAGE charakterisiert in diesem Modell den intakten Insulinrezeptor. Die weiteren gefundenen Banden mit kleinerem Molekulargewicht entstehen aus diesem Gesamtrezeptor durch Abbauprozesse. Bande 2 entsteht aus Bande 1 wahrscheinlich durch proteolytische oder glykosidische Abspaltung eines $ß_1$-Teilstücks, da ihre Entstehung durch keine in dieser Arbeit verwendeten Hemmstoffe beeinflußt werden konnte. Für die Entstehung der Bande 3 gibt es zwei Möglichkeiten: sie könnte direkt aus Bande 1 durch reduktive Abspaltung einer ß-Untereinheit entstehen. Dieser Entstehungsprozess ist durch SH-Blocker und Oxidationsmittel hemmbar und wird durch Reduktionsmittel verstärkt. Bande 3 könnte aber auch aus Bande 2 durch proteolytische Abspaltung eines weiteren $ß_1$-Teilstückes entstehen. Wahrscheinlich sind beide Wege möglich, da die Entstehung von Bande 3, wie Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, sich durch SH-Blocker und Oxidationsmittel nur teilweise hemmen läßt. Die Banden 1 - 3 (3 teilweise) liegen wahrscheinlich schon in der Zelle vor. Alle weiteren Banden 4,5,6,7,r1 und r2 entstehen aus den Banden 1-3 durch Reduktion. Ihre Entstehung läßt sich durch SH-Blocker ganz und durch Oxidationsmittel weitgehend verhindern. Reduktionsmittel verstärken das Auftreten dieser Banden. Wahrscheinlich entstehen sie zum größten Teil erst während der Präparation der Membranen bzw. der gelösten Rezeptoren durch zellständige Reduktionsmittel (GSH u.ä.).

Diese abschließenden Überlegungen zur Struktur des Insulinrezeptors lassen Fragen offen. Es bleibt zu klären,wie und wann die Banden 2 und 3 aus Bande 1, dem nativen Insulinrezeptor, entstehen, nachdem lediglich nachgewiesen werden konnte, daß der Einsatz von Redoxreagenzien und SH-Blockern das Entstehen der Banden 4,5,7 und 8 und mit Einschränkung 3 und 6, beeinflußen konnte. Unbeantwortet bleibt auch die Frage, wie und wann r2 entsteht.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung, ob die in der SDS-PAGE gefundenen spezifischen Insulin-Rezeptorbanden in vivo oder in vitro entstehen, wurden membrangebundene und mit Triton-X-100 solubilisierte Insulinrezeptoren aus Rattenlebermikrosomen verwendet und den Präparationsansätzen jeweils verschiedene Hemmstoffe zugefügt. Nach Photoaffinitätsmarkierung mit ^{125}J-MABI wurden die Rezeptoren mittels SDS-PAGE (Laemmli-Gradientengele) analysiert und anschließend autoradiographiert. Bei den Kontrollwerten fanden sich i.d.R. unter nicht reduzierenden Bedingungen 6 spezifische Rezeptorbanden mit Molekulargewichten zwischen 428 000 und 218 000 und unter reduzierenden Bedingungen r1 (MG 133 000) und r2 (MG 115 000). Von den ausgetesteten Substanzen beeinflußten nur die SH-Blocker und Redoxreagenzien das Bandenmuster des Insulinrezeptors, wobei die Einflußnahme sich auf die Banden 4-7 und teilweise auf die Bande 3 beschränkte. Die Entstehung dieser Banden konnte mit SH-Blockern und Oxidationsmitteln mehr oder weniger vollständig gehemmt werden, während unter Einsatz von Reduktionsmitteln sich diese Banden verstärkten. Die Banden 1 und 2 und mit Einschränkung 3 sowie r1 ließen sich durch keine getestete Substanz beeinflussen. Das heißt, daß neben dem Gesamtrezeptor, charakterisiert durch die Bande 1 in der SDS-PAGE, die den Banden 2 und 3 entsprechenden Untereinheiten wahrscheinlich schon in der Zelle vorliegen und es sich bei den sonst gefundenen Banden um Abbauprodukte handelt, sie erst während der Präparation entstehen. Bezüglich der Struktur des Insulinrezeptors wurde das von Czech et al. und Jacobs et al. postulierte symmetrische Tetramer um die Banden 4 und 5 erweitert.

8. L I T E R A T U R

1. Amatruda, J.M., Finch, E.D.
" Modulation of Hexose Uptake and Insulin Action by Cell Membrane Fluidity "
J. Biol. Chem. 254, 2619-2625 (1979)

2. Baldwin, D., Jr., Prince, M., Marshall, S., Davies, P., Olefsky, J.M.
" Regulation of Insulin Receptors: Evidence for Involvement of an Endocytotic Internalization Pathway "
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5975-5978 (1980)

3. Baron, M.D., Sönksen, P.H.
" Elucidation of the Quaternay Structure of the Insulin Receptor "
Biochem. J. 212, 79-84 (1983)

3a. Baron, M.D., Sönksen, P.H.
" Characterization of two Insulin-Binding Components of Rat Liver Plasma Membranes "
Bioscience Reports 2, 785-793 (1982)

4. Barron, E.S.G.
" Thiol Groups of Biological Importance "
Advanc. Enzymol. 11, 201- 258 (1951)

5. Barrett, A.J., Mc Donald, J.K.
" Mammalian Proteases A Glossary and Bibliography Volume I Endopeptidases "
Academic Press (1980)

6. Benöhr, H.Chr., Waller, H.D.
" Glutathion (Bedeutung in Biologie und Medizin)"
Klin. Wschr. 53, 789-802 (1975)

7. Brush, J.S.
" Studies on Inhibitors of Insulin Protease of Rat Liver "
Biochem. Pharmacol. 26, 2349-2354 (1977)

8. Carpentier, J.L., Gordon, P., Freychet, P., Le Cam, A., Orci, L.

" Lysosomal Association of Internalized ^{125}J-Insulin in Isolated Rat Hepatocytes. Direct Demonstration by Quantitative Electron Microscopic Autoradiography "

J. Clin. Invest. 63, 1249-1261 (1979)

9. Caro, J.F., Amatruda, J.M.

" Functional Relationships Between Insulin Binding, Action and Degradation. A Reassessment. "

J. Biol. Chem. 255, 10052-10055 (1980)

10. Cheng, K., Galasko, G., Hunag, L., Kellog, J., Larner, J.

" Studies of the Insulin Mediator II. Separation of Two Antagonistic Biologically Active Materials from Fraction II. "

Diabetes 29, 659 (1980)

11. Chong, M.T., Garrard, W.T., Bonner, J.

" Purification and Properties of a Neutral Protease from Rat Liver Chromatin "

Biochemistry 13, 5128-2134 (1974)

12. Cuatrecasas, P., Hollenberg, M.D.

" Membrane Receptors and Hormone Action "

Adv. Protein Chem. 30, 251-451 (1976)

13. Cuatrecasas, P.

" Properties of the Insulin Receptor Isolated from Liver and Fat Cell Membranes "

J. Biol. Chem. 247, 1980-1991 (1972)

14. Cuatrecasas, P.

" Isolation of the Insulin Receptor of Liver and Fat-Cell Membranes "

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 318-322 (1972)

15. Czech, M.P.

" Molecular Basis of Insulin Action "

Ann. Rev. Biochem. 46, 359-384 (1977)

16. Czech, M.P.

" Insulin Action "

Am. J. Med. 70, 142-150 (1981)

17. Davis, D.J.

" Disc Electrophoreses - II. Method and Application of Human Serum Proteins "

Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 407-417 (1964)

18. Deger, A.

" Vergleich der Insulinrezeptoren aus Plasmamembranen, Mikrosomen und Kernmembranen der Rattenleber "

Diplomarbeit Universität, Tübingen (1983)

19. Deger, A., Koch, R., Klotz, K.-N., Jäck, H.-M., Müller, G., Rapp, R., Weber, U.

" Comparison of Insulin Receptors from Plasma Membranes and Microsomes of Rat Liver "

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1114-1115 (1983)

20. De Meyts, P., Roth, J., Neville, D.M., Jr., Gavin, J.R., III and Lesniak, M.A.

" Insulin Interactions With its Receptors: Experimental Evidence for Negative Cooperativity "

Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 154-161 (1973)

21. Dennis, P.A., Aronson Jr., N.N.

" The Effects of Low Temperature and Chloroquine on ^{125}J-Insulin Degradation by the Perfused Rat Liver "

Arch. Biochem. Biophys. 212, 170-176 (1981)

22. Donner, D.B.

" Receptor- and Non-Receptor-Mediated Uptake and Degradation of Insulin by Hepatocytes "

Biochem. J. 208, 211-219 (1982)

23. Draznin, B., Solomons, C.C., Toothaker, D.R., Sussman, K.E.

" Energy-Dependent Steps in Insulin-Hepatocyte Interaction "

Endocrinology 108, 8-17 (1981)

24. Duckworth, W.C., Heinemann, M.A., Kitabchi, A.E.

" Purification of Insulin-Specific Protease by Affinity Chromatography "

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3698-3702 (1972)

25. Eckel, J., Reinauer, H,

" Der Insulinrezeptor "

Biologie in unserer Zeit 5, 150-155 (1981)

26. Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H.

" Electrophoretic Analysis of the Major Polypeptides of the Human Erythrocyte Membrane "

Biochemistry 10, 2606-2617 (1971)

27. Fehlmann, M., Carpentier, J.L., Van Obberghen, E., Freychet, P., Thamm, P., Saunders, D., Brandenburg, D., Orci, L.

" Internalized Insulin Receptors are Recycled to the Cell Surface in Rat Hepatocytes "

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5921-5925 (1982)

28. Fehlmann, M., Le Marchaud-Brustel, Y., Van Obberghen, E., Brandenburg, D., Freychet, P.

" Photoaffinity Labelling of the Insulin Receptor in Intact Rat Hepatocytes, Mouse Soleus Muscle and Cultured Human Lymphocytes "

Diabetologia 12, 440-444 (1982)

29. Frank, R.N., Robard, D.

" Precision of Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide-Gel Electrophoreses for the Molecular Weight Estimation of a Membrane Glycoprotein: Studies on Bovine Rhodopsin "

Arch. Biochem. Biophys. 171, 1-13 (1975)

30. Freychet, P.

" Interactions of Polypeptide Hormones With Cell Membrane Specific Receptors: Studies With Insulin and Glucagon "

Diabetologia 12, 83-100 (1976)

31. Friedmann, E., Marriau, D.H., Simon-Reuss, J.

" Mitosis of Chick Fibroblasts in the Presence of Unsaturated Imides and Sulphydryl Compounds "

Br. J. Pharmacol. 4, 105 (1949) und
Br. Biophys. Acta 9, 61 (1952)

32. Friedmann, E.

" Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Glutathione with Maleimide and N-Ethylmaleimide "

Biochem. Biophys. Acta 9, 65 (1952)

33. Gavin, J.R., III, Roth, J., Neville, D.M., Jr., De Meyts, P., Buell, D.N.

" Insulin-Dependent Regulation of Insulin Receptor Concentrations: A Direct Demonstration in Cell Culture "

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 84-88 (1974)

34. Ginsberg, B.H., Kahn, C.R., Roth, J., De Meyts, P.

" Insulin Induced Dissociation of its Receptor into Subunits: Possible Molecular Concomitant of Negative Cooperativity "

Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 1068-1074 (1976)

35. Ginsberg, B.H., Brown, T.J., Simon, I., Spector, A.A.

" Effect of Membrane Lipid Enviroment on the Properties of Insulin Receptors "

Diabetes 30, 773-780 (1981)

36. Gliemann, J., Sonne, O.

" Binding and Receptor-Mediated Degradation of Insulin in Adipocytes "

J. Biol. Chem. 253, 7857-7863 (1978)

37. Gordon, Ph., Carpentier, J.L., Freychet, P., Orci, L.

" Internalization of Polypeptide Hormones. Mechanism, Intracellular Localization and Significance "

Diabetologia 18, 263-274 (1980)

38. Gould, R.J., Ginsberg, B.H., Spector, A.A.

" Lipid Effects on the Binding Properties of a Reconstituted Insulin Receptor "

J. Biol. Chem. 257, 477-484 (1982)

39. Hammons, G.T., Smith, R.M., Jarett, L.

" Inhibition by Bacitracin of Rat Adipocyte Plasma Membrane Degradation of ^{125}J-Insulin is Associated with Increase in Plasma Membrane Bound Insulin and a Potentiation of Glucose Oxidation by Adipocytes "

J. Biol. Chem. 257, 11563-11570 (1982)

40. Harmon, J.T., Kahn, C.R., Kempner, E.S., Schlegel, W.

" Characterization of the Insulin Receptor in its Membrane Enviroment by Radiation Inactivation "

J. Biol. Chem. 255, 3412-3419 (1980)

40a. Heinrich, J., Pilch, P.F., Czech, M.P.

" Purification of Adipocyte Insulin Receptor by Immunaffinity Chromatography "

J. Biol. Chem. 255, 1732-1737 (1980)

41. Hofmann, C., Marsh, J.W., Miller, B., Steiner, D.F.

" Cultured Hepatoma Cells as a Modell System for Studying Insulin Processing and Biologic Responsiveness "

Diabetes 29, 865-874 (1980)

42. Hunter, W.M., Greenwood, F.C.

" Preparation of Jodine-131 Labelled Human Growth Hormone of High Specific Activity "

Nature 194, 495-496 (1962)

43. Jwamoto, Y., Roach, E., Bailey, A., Williams, J.A., Goldfine, D.J.D.

" The Effect of Chloroquine on the Binding, Intracellular Distribution and Action of Insulin on Isolated Mouse Pancreatic Acini "

Diabetes 32, 1102-1109 (1983)

44. Jacobs, S., Hazum, E., Cuatrecasas, P.

" The Subunit Structure of Rat Liver Insulin Receptor: Antibodies directed Against the Insulin Binding Subunit "

J. Biol. Chem. 255, 6937-6940 (1980)

45. Jäck, H.-M.

" Partielle Reinigung des Insulinrezeptors aus Rattenlebermikrosomen und Immunpräzipitation des Rezeptors mit Antiseren und Monoklonalen Antikörpern "

Diplomarbeit,Universität Tübingen (1984)

46. Jarret, L.

" Pathophysiology of the Insulin Receptor "

Human Pathology 10, 301-311 (1979)

47. Jarret, L., Parker, J.C., Macaulay, S.L., Kelly, K.L., Kiechle, F.L.

" Characteristics of Insulin Mediator "

2nd Internat. Symposium on Insulin Receptors, Rom Abstracts of Reports, 30 (1983)

48. Jørgensen, K.H., Larson, U.D.

" Homogeneous Mono-^{125}J-Insulins "

Diabetologia 19, 546-555 (1980)

49. Kahn, C.R., Freychet, P., Roth, J.

" Quantitative Aspects of the Insulin-Receptor Interaction in Liver-Plasma-Membranes "

J. Biol. Chem. 249, 2249-2257 (1974)

50. Kahn, C.R.

" Membrane Receptors of Hormones and Neurotransmitters "

J. Cell Biol. 70, 261-286 (1976)

51. Keefer, L.M., De Meyts, P.

Glycosylation of Cell Surface Receptors: Tunicamycin Treatment Decreases Insulin and Growth Hormone Binding to Different Levels in Cultured Lymphocytes "

Biochem. Biophys. Res. Commun. 101, 22-29 (1981)

52. Kelm, S.

" Vergleich von Insulinrezeptoren verschiedener Gewebe: Bindung von Mono-^{125}J-(Tyr^{A14})-Insulin und SDS-Gelelektrophorese "

Diplomarbeit,Universität Tübingen (1983)

52a. Kelm, S.

persönliche Mitteilung

53. Klotz, K.-N.

" Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors in Rattenleberzellen "

Diplomarbeit, Universität Tübingen (1979)

54. Klotz, K.-N.

" Eigenschaften des Insulinrezeptors in isolierten Rattenhepatocyten. Untersuchungen zur Struktur des Rezeptors und zur Internalisierung von Insulin und Rezeptor "

Dissertation, Universität Tübingen (1984)

55. Koch, R.

" Untersuchungen zur Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor aus Rattenlebermembranen: Ausarbeitung eines Radiorezeptortests "

Diplomarbeit, Universität Tübingen (1978)

56. Koch, R.

" Partielle Reinigung und Charakterisierung des Insulinrezeptors aus Rattenlebermembranen"

Dissertation, Universität Tübingen (1981)

57. Koch, R., Weber, U.

" Partial Purification of the Solubilized Insulin Receptor from Rat Liver Membranes by Precipitation with Concanavalin A "

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 347-351 (1981)

58. Koch, R., Kelm, S., Weber, U.

" Anomalous Behaviour of the Photoaffinity Labeled Insulin Receptor in SDS-Gel Electrophoresis "

2nd Intern. Symposium on Insulin Receptors, Rom Abstracts of Reports, 17 (1983)

59. Koch, R., Klotz, K.-N., Kelm, S., Deger, A., Jäck, H.-M., Weber, U.

" Eigenschaften des Insulinrezeptors aus Rattenlebermembranen "

Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 345 (1983)

60. Kopp, F.

Biochemische Abteilung des Diabetes Forschungsinstitutes an der Universität Düsseldorf

persönliche Mitteilung

61. Krupp, M.N., Livingston, J.N.

" The Binding and Degradation of Insulin by Rat Liver Membranes: Demonstration of Three Distinct Insulin-Binding Components in Detergent-Solubilized Material from Liver Plasma Membrane "

Endocrinology 106, 179-184 (1980)

62. Krupp, M.N., Lane, M.D.

" Evidence for Different Pathways for the Degradation of Insulin and Insulin Receptor in the Chick Liver Cell "

J. Biol. Chem. 257, 1372-1377 (1982)

63. Laemmli, U.K.

" Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T 4 "

Nature 227, 680-685 (1970)

64. Lehninger, A.L.

" Mikrofilamente und Cytochalasin B "

Biochemie, Verlag Chemie, Weinheim/New York (1977)

65. Levin, R., Goldstein, M.S.

" On the Mechanism of Action of Insulin "

Recent Progr. Horm. Res. 11, 343-380 (1955)

66. Lowry, O.P., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.

" Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent "

J. Biol. Chem. 193, 2093-2103 (1951)

67. Mäkinen, K.K.

" Inhibition by Bacitracin of Some Hydrolytic Encymes "

Int. J. Protein Research 4, 21-28 (1972)

68. Mahoney, W.C., Duksin, D.

" Biological Activities of the Two Major Components of Tunicamycin "

Biol. Chem. 254, 6572-6576 (1979)

69. Marshall, S., Olefsky, J.M.

" Effects of Lysosomotropic Agents on Insulin Interactions with Adipocytes "

J. Biol. Chem. 254, 10153-10160 (1979)

70. Massague, J., Czech, M.P.

" Multiple Redox Forms of the Insulin Receptor in Native Liver Membranes "

Diabetes 29, 945-947 (1980)

70a. Massague, J., Pilch, P.F., Czech, M.P.

" Electrophoretic Resolution of Three Major Insulin Receptor Structures with Unique Subunit Stoichiometries "

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7137-7141 (1980)

71. Maturo, J.M., Hollenberg, M.D.

" Insulin Receptor: Interaction with Nonreceptor Glycoprotein from Liver Cell Membranes "

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3070-3074 (1978)

72. Mohr, E., Schramm, G.

" Hemmung der Neuraminidase aus Vibrio Cholerae "

Z. Naturforschung 156, 575-577 (1960)

73. Müller, G.

" Untersuchung der Insulinabbau-Aktivität in Triton-X-100-Extrakten aus Rattenlebermembranen "

Diplomarbeit, Universität Tübingen (1980)

74. Muggeo, M., Ginsberg, B.H., Roth, J., Neville, D.M., Jr., De Meyts, P., Kahn, C.R.

" The Insulin Receptor in Vertebrates is Functionally More Conserved During Evolution Than Insulin Itself "

Endocrinology 104, 1393-1402 (1979)

74a. Olefsky, J.M., Marshall, S., Berhanu, P., Saekow, M., Heidenreich, K., Green A.

" Internalization and Intracellular Processing of Insulin and Insulin Receptors in Adipocytes "

Metabolism 31, 670-690 (1982)

75. Peterson, G.L.

" A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry "

Anal. Chem. 83, 346-356 (1977)

76. Plas, Ch., Desbuquois, B.

" Receptor-Mediated Insulin Degradation and Insulin-Stimmulated Glycogenesis in Cultured Foetal Hepatocytes "

Biochem. J. 202, 333-341 (1982)

77. Poduslo, J.F.

" Glycoprotein Molecular-Weight Estimation Using Sodium Dodecyl Sulfate-Pore Gradient Electrophoresis: Comparison of Tris-Glycin and Tris-Borate-EDTA Buffer Systems "

Anal. Biochem. 114, 131-139 (1981)

78. Posner, B.I., Verma, A.K., Patel, B.A., Bergeron, J.J.M.

" Effect of Colchicine on the Uptake of Prolactin and Insulin into Golgi Fractions of Rat Liver "

J. Cell Biol. 93, 560-567 (1982)

79. Prime, S.S., Tok, B.H.

" Co-Capping of Insulin, Epidermal Growth Factor and Concanavalin A Surface Receptors With Each Other and With Cytoplasmic Actin "

Cytobios. 28, 151-160 (1980)

80. Reed, B.C., Ronnett, G.V., Lane, M.D.

" Role of Glycosylation and Protein Synthesis in Insulin Receptor Metabolism by 3T3-L1 Mouse Adipocytes "

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, No. 5, 2908-2912 (1981)

81. Rösen, P., Ehrlich, B., Junger, E., Bubenzer, H.J., Kuehn, L.

" Binding and Degradation of Insulin by Plasma Membranes from Bovine Liver Isolated by a Large Scale Preparation "

Biochem. Biophys. Acta 587, 593-605 (1979)

82. Richterich, R.

" Gesamt-Eiweiß: Methode von Folin-Ciocalteau "

Klin. Chem. 2. Auflage, 243
Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M. (1968)

83. Rosen, O.M., Chia, G.H., Fung, C., Rubin, C.S.

" Tunicamycin Mediated Depletion of Insulin Receptors in 3T3-L1 Adipocytes "

J. Cell Physiol. 99, 37-42 (1979)

84. Roth, R.A.

" Bacitracin: An Inhibitor of the Insulin Degrading Activity of Glutathione-Insulin-Transhydrogenase "

Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 431-438 (1981)

85. Sanger, J.W., Holtzer, H.

" Cytochalasin B: Effects on Cell Morphology, Cell Adhesion and Mucopolysaccharides Synthesis "

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 253-257 (1972)

86. Seglen, P.O., Grinde, B., Solheim, A.E.

" Inhibition of the Lysosomal Pathway of Protein Degradation in Isolated Rat Hepatocytes by Ammonia, Methylamine, Chloroquine and Leupeptin "

Eur. J. Biochem. 95, 215-225 (1979)

87. Sonne, O., Gliemann, J.

"Insulin Receptors of Cultured Human-Lymphocytes (IM-9) "

J. Biol. Chem. 255, 7449-7454 (1980)

88. Takahashi, M., Takano, M., Asada, K.

" Tris-Induced Cross-Linking of Thylakoid Peptides; Thiol Oxidation Catalyzed by Tris-Cu^{2+} Complexes as a Possible Mechanism "

J. Biochem. 90, 87-94 (1981)

89. Takatsuki, A., Arima, K., Tamura, G.

" Tunicamycin, A. New Antibiotic. I
Isolation and Characterization of Tunicamycin "

J. Antibiot. 24, 215 (1971)

90. Takatsuki, A., Kawamura, K., Okina, M. et al.
" The Structur of Tunicamycin "
Agric. Biol. Chem. 41, (11), 2307-2309 (1977)

91. Tang, J.
" Specific and Irreversible Inactivation of Pepsin by Substrate-like Epoxides "
J. Biol. Chem. 246, 4510-4517 (1971)

92. Umezawa, H.
" Structures and Activities of Protease Inhibitors of Microbial Origin "
Meth. Enzymol. 45, 678-694 (1976)

93. Varandani, P.T.
" Unmasking of Glutathione-Insulin-Transhydrogenase in Rat Liver Microsomal Membrane "
Biochem. Biophys. Acta 304, 642-659 (1973)

94. Veh, R.W., Schauer, R.
" Interaction of Human Brain Neuraminidase with Tritium-Labelled Gangliosides "
Enzymes od Lipid Metabolism, Hrsg. Glatt, Freyst, Mandel Plenum Publ., Corp., 447-462 (1978)

95. Wasner, H.K.
" Prostaglandyl-Inositol Cyclic Phosphate, a Second Messenger of Insulin "
2nd Intern. Symposium on Insulin Receptors, Rom Abstracts of Reports, 33 (1983)

96. Yip, C.C., Yeung, C.W.T., Moule, M.L.
" Photoaffinity Labeling of Insulin Receptor Proteins of Liver Plasma Membrane Preparations "
Biochemistry 19, 70-76 (1980)

97. Yip, C.C., Moule, M.L., Yeung, C.W.T.
" Characterization of Insulin Receptor Subunits in Brain and other Tissues by Photoaffinity Labeling "
Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 1671-1678 (1980)

98. Yip, C.C., Moule, M.L., Yeung, C.W.T.

" Subunit Structure of Insulin Receptor of Rat Adipocytes as Demonstrated by Photoaffinity Labeling "

Biochemistry 21, 2940-2945 (1982)

Lebenslauf

1950	Am 1. Februar wurde ich, Marianne Ingeborg Hinz, als Tochter des Georg Hinz und der Hildegard Hinz, geb. Haupt, in Reutlingen geboren.
1956 — 1961	Besuch der Katholischen Volksschule in Reutlingen.
1961 — 1966	Besuch der Realschule in Reutlingen, mit Reifeprüfung am 18.11.1966
1966 — 1971	Angestellte bei der Deutschen Bank AG, Reutlingen.
September 1970— Juni 1974	Besuch des Abendgymnasiums in Reutlingen. mit Reifeprüfung am 15.6.1974
1974 — 1977	Angestellte bei den Rechtsanwälten Dr. Gehrke, Dr. Kroll u.a., Reutlingen
April 1977	Beginn des Studiums der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen.
20. April 1983	Abschluß des Studiums der Medizin mit Bestehen der letzten Ärztlichen Prüfung.
Juni 1983 — Juni 1984	Arbeit an der vorliegenden Dissertation mit dem Thema »Einfluß verschiedener Hemmstoffe auf das Bandenmuster des Insulinrezeptors in der SDS-Gelelektrophorese« in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. U. Weber am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.
30. Mai 1984	Approbation als Arzt